

ASZTROCITÓMÁK INVAZIVITÁSÁNAK SZEREPE A SZEMÉLYRE SZABOTT ONKOTERÁPIÁBAN

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Dr. Klekner Álmos



**DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI KÖZPONT
IDEGSEBÉSZETI KLINIKA**

Debrecen, 2016

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	6
1.1. Általános klinikai háttér	6
1.2. A temozolomid szerepe a glioblasztóma kezelésében	7
1.3. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) szerepe az asztrocitómákban.....	9
1.3.1. Az EGFR és az integrinek kölcsönhatásának szerepe az asztrocitómákban	9
1.3.2. Az EGFR mutáció szerepe glioblasztómákban	10
1.4. A gliómák és az extracelluláris mátrix.....	11
1.4.1. Az extracelluláris mátrix szerepe az invázióban.....	12
1.4.2. A gliómák peritumorális inváziójának molekuláris megközelítése	13
1.4.3. A tumorsejtek inváziójának folyamata.....	14
1.4.4. A gliómák inváziójában szerepet játszó extracelluláris mátrix komponensek vizsgálatának klinikai jelentősége	16
1.5. Az anti-invazív terápia létjogosultsága	16
2. CÉLKITŰZÉSEK	18
3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	20
3.1. A Debreceni Neuro-onkológiai Labor kialakítása	20
3.1.1. Szervezeti háttér.....	20
3.1.2. Az Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank jelentősége	21
3.1.3. Az Agydaganatbank gyakorlati működése során kifejlesztett saját technikák	22
3.2. A jelenlegi onkoterápia hatékonyságának meghatározása glioblasztóma esetében saját beteganyagon.....	23
3.3. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagon: az 1 p19q kodelécio klinikai relevanciája oligodendrogliómákban és oligoasztrocitómákban.....	24
3.4. A temozolomid vizsgálata glioblasztómában	26
3.4.1. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztómás betegben	26
3.4.2. A temozolomid intratumorális koncentrációjának direkt meghatározása humán glioblasztómában	27
3.5. Az EGFR és az integrinek kölcsönhatásának szerepe asztrocitómákban	28
3.5.1. Az ErbB1 (EGFR) és az integrin- β 1 közti molekuláris interakció vizsgálata asztrocitómákban	28

3.5.2. Az EGFR mutáció szerepének vizsgálata rekurrens glioblasztómában	30
3.6. Agyi áttéti daganat és gliómák invazivitásának összehasonlítása	31
3.7. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára	38
3.8. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban	40
3.9. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblasztómában	42
4. EREDMÉNYEK	44
4.1. A jelenlegi onkoterápia effektivitásának meghatározása glioblasztóma esetében saját beteganyagon.....	44
4.2. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagon: az 1 p19q kodelécio klinikai relevanciája oligodendrogliómákban.....	49
4.3. A temozolomid vizsgálata glioblasztómában	53
4.3.1. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztómás betegekben.....	53
4.3.2. A temozolomid intratumorális koncentrációjának közvetlen meghatározása humán glioblasztómában	55
4.4. Az EGFR és az integrinek kölcsönhatásának szerepe asztrocitómákban	56
4.4.1. Az ErbB1 (EGFR) és az integrin- β 1 közti molekuláris interakció vizsgálata asztrocitómákban	56
4.4.2. Az EGFR mutáció szerepének vizsgálata rekurrens glioblasztómában	58
4.5. Agyi áttéti daganat és gliómák invazivitásának összehasonlítása	59
4.5.1. mRNS expressziós eredmények.....	59
4.5.2. Immunhisztokémiai eredmények	64
4.6. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára	66
4.6.1. RNS expressziós eredmények.....	66
4.6.2. Proteomikai eredmények	66
4.7. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban	69
4.7.1. RNS expressziós eredmények.....	69
4.7.2. Proteomikai eredmények	70
4.8. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblasztómában	72
4.8.1. A betegek klinikai adatainak eredményei.....	72
4.8.2. Az inváziós molekulák RNS expressziós mintázata	72
4.8.3. Protein expressziós eredmények	74
5. MEGBESZÉLÉS	76
5.1. A Neuro-onkológiai Labor kutatási hatékonysága	76

5.2. A jelenlegi onkoterápia effektivitásának meghatározása glioblasztóma esetében saját beteganyagon.....	77
5.3. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagon: az 1 p19q kodelécio klinikai relevanciája oligodendrogliómákban és oligoasztrocitómákban.....	80
5.4. A temozolomid vizsgálata glioblasztómában.....	82
5.4.1. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztómás betegben	82
5.4.2. A temozolomid intratumorális koncentrációjának direkt meghatározása humán glioblasztómában.....	83
5.5. Az EGFR és az integrinek kölcsönhatásának szerepe asztrocitómákban	84
5.5.1. Az ErbB1 (EGFR) és az integrin- β 1 közti molekuláris interakció vizsgálata asztrocitómákban.....	84
5.5.2. Az EGFR mutáció szerepének vizsgálata rekurrens glioblasztómában.....	85
5.6. Agyi áttéti daganat és gliómák invazivitásának összehasonlítása	86
5.6.1. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztatizálásában és glioblasztómában	86
5.6.2. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztatizálásában, alacsony grádusú asztrocitómában és schwannomában	88
5.7. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára	90
5.8. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban	91
5.9. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblasztómában	93
6. ÖSSZEFOGLALÁS	95
6.1. Általános összefoglalás	95
6.2. A disszertációban megerősített vagy módosított korábbi tudományos eredmények	96
6.3. A disszertációban megállapított új tudományos eredmények	97
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	99
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	114
KUTATÁSI TÁMOGATÁSOK.....	114
9. PUBLIKÁCIÓK	115
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	115
További közlemények.....	117

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIC – 5-amino-imidazol-4-carboxamid
BC – bevacizumab
BSC – best supportive care
CE – kapilláris elektroforézis
DE KK – Debreceni Egyetem Klinikai Központ
ECM – extracelluláris mátrix
EGFR – epidermal growth hormone receptor
EOF – elektroosmotikus áramlás
FBRT – focal brain radiotherapy
FISH – fluoreszcens in situ hibridizáció
FRET – fluoreszcencia energia transzfer
GAG – glükózaminoglikán
GBM – glioblasztóma
HA – hialuronsav
HAS – hialuronsav szintetáz
KIR – központi idegrendszer
KPS – Karnofsky Performance Score
KT - kemoterápia
MEKC – micelláris elektrokinetikai kapilláris kromatográfia
MMP – mátrix metalloproteináz
MTIC – 3-metil-triazén-imidazole-4-carboxamid
NSCLC – non-small cell lung cancer
OA – oligoasztrocitóma
OD – oligodendroglióma
OS – overall survival
PFS – progression free survival
PG – proteoglikán
pRT – palliatív radioterápia
QRT-PCR – quantitative real time polymerase chain reaction
RHAMM – receptor for hyaluronate-mediated motility
RT – radiotherapy
TK – tirozin kináz
TKI – tirozin kináz inhibitor
TMZ – temozolomide
VEGF – vascular endothel growth hormone
WBRT – whole brain radiotherapy

1. BEVEZETÉS

1.1. Általános klinikai háttér

A primer agydaganatok az összes daganatos megbetegedésnek ugyan csak 2 %-át alkotják, de mortalitásuk szempontjából jelentőségük kiemelkedő. Legnagyobb csoportjuk, a gliómák az összes intrakraniális tumor 30-40%-át teszi ki. Leggyakoribb típusa az asztrocitóma, melynek a WHO szerinti legmagasabb, IV-es grádusú és egyben leggyakoribb képviselője a *glioblastoma multiforme* (GBM) [1–3]. A GBM incidenciája az Egyesült Államokban 3/100.000/év, férfiakban mintegy másfélszer gyakoribb, mint nőkben. Tipikusan az aktív keresőképes középkorúak betegsége, 40 és 65 év között fordul elő a leggyakrabban, a betegek átlagéletkora 54 év. [4, 5]. A felnőttekben a gliómák nagyjából fele (46%) GBM. A hosszú távú túlélés nagyon ritka, és a legújabb terápiás eszközök bevezetésével is csak 9.8%-os 5 éves túlélés érhető el, míg onkoterápia nélkül a várható átlagos túlélés nem több mint 3-6 hónap [6]. Irodalmi adatok szerint a fiatalabb kor előnyösebb prognózist jelent, ill. a férfiak túlélési adatai kedvezőbbek a női betegeknél [7].

A GBM kezelésének első lépése az esetek többségében a műtéti reszekció. A tumor egy része elhelyezkedésétől függő mértékben sebészileg eltávolítható, de az igen kiterjedt peritumorális infiltráció miatt a radikális reszekció szinte soha nem valósítható meg. Az idegsebész lehetőségeit a daganat elhelyezkedése, kiterjedtsége jelentősen befolyásolja, és a többlebenyi valamint kétoldali érintettség a megfigyelések szerint igen rossz prognózissal jár. A jelenlegi irodalmi adatok szerint a rossz preoperatív *Karnofsky Performance Score* (KPS), a domináns féltekei érintettség és a nagy tumorméret is csökkenti a túlélési esélyeket [8].

Korábban a glioblasztómás betegek kezelésére általánosan elfogadott és alkalmazott posztoperatív terápiaként évtizedeken keresztül egyedül az egész agy besugárzás (*whole brain radiotherapy*, WBRT) szolgált, ami az átlagos túlélést a kezelés nélkül várható 3-6 hónapról 9-12 hónapra emelte [9–13]. A WBRT-t a későbbiekben felváltotta a *focal brain radiotherapy* (FBRT) amit kemoterápiával (KT) - temozolomid (TMZ) - egészítettek ki, ami a túlélési paraméterek jelentős javulását hozta. A 2005-ben készült Stupp-tanulmányt követően a 70 év alatti, jó KPS ponttal rendelkező betegek számára a standard terápia részévé vált a sugárterápiával (RT) egy időben adott adjuváns kemoterápia (75mg/m²/nap), amelyet további kemoterápiás kezelés követ (havi ciklusban 150-200 mg/m²/nap dózisban általában 6-12

hónapon át, havonta 5 napig).[14] A jelenleg is standard protokollnak számító konkuráló kemo-irradiációs kezelés növelte mind a progressziómentes túlélést (PFS) (4,5 hónapról 6,9 hónapra), mind a teljes túlélést (OS) (8,6 hónapról 14,6 hónapra) [6, 14–19].

A konkuráló kemo-irradiáció ellenére kialakuló tumorprogresszió esetén a kezelés folytatható bevacizumab monoterápiával, mely a biológiai válaszmódosító kezelés eszköze. A bevacizumab monoklonális humanizált antitest, amelyet a *vascular endothel growth factor-A* (VEGF-A) ellen termeltek. A GBM jelentősen vaszkularizált tumortípus, és fokozottan igényel VEGF-et és egyéb proangiogenetikus faktorokat az érújdonképződéshez [16]. Világszerte számos tanulmány vizsgálta a bevacizumab antitumor hatását, melyekből az a következtetés vonható le, hogy bár a bevacizumab nem befolyásolja szignifikánsan az OS-t, ugyanakkor a PFS időtartamát meghosszabbítja [16, 17, 20–23]. A gyakorlatilag mindig bekövetkező tumorprogresszió után a másodvonalbeli terápia indikációjának klinikai állapothoz kötött feltételei azonban az esetek nagy részében nem engednek meg további kemoterápiát. Továbbá, a bevacizumab monoterápia alatt bekövetkező progresszió esetén a további kezelések megválasztása általánosan elfogadott protokoll híján erősen intézetfüggőnek és experimentális jellegűnek mondható. Nem véletlen, hogy napjainkban egyre több kutatás irányul mind a jelenlegi onkoterápia ineffektivitása okának felderítésére, mind pedig további kemoterapeutikumok bevezetésére. A hazai betegállomány terápiafüggő túlélési paramétereiről kevés adat áll rendelkezésre, ezért ahhoz, hogy klinikai konzekvenciákat eredményező kutatást végezhessünk, a saját betegadataink feldolgozása adja meg a kiindulási és viszonyítási alapot.

1.2. A temozolomid szerepe a glioblasztóma kezelésében

A glioblasztómás betegek jelenlegi standard terápiájának gerincét képező kemoterapeutikum, a TMZ alkalmazása mellett előbb-utóbb mindig bekövetkező tumorprogresszió okainak megértése fontos lépés a kezelés hatékonyságának javítására irányuló törekvésekhez.

A TMZ egy olyan orális alkiláló ágens, melyet a vér-agy gáton történő permeabilitási tulajdonságai alkalmassá tesznek a *high grade* gliómák kezelésére. A TMZ fiziológiás pH értéken spontán hidrolizál (3-metil-triazén-imidazole-4-carboxamiddá, MTIC). A MTIC tovább hidrolizál 5-amino-imidazol-4-carboxamiddá (AIC), amely a tulajdonképpeni aktív alkiláló ágenssé, metilhidrazinná alakul. Ez az erősen reaktív kation a DNS-ben az O6

pozícióban lévő guaninokat metilálja és így bázispár *mismatch*-et okoz. A sikertelen *mismatch* javítások vezetnek a DNS leány szálának töréséhez, ami a sejt apoptózist okozza [24].

A TMZ dozírozásánál a szövődmények előfordulási valószínűsége (mieloszuppresszív hatás) az elsődleges korlátozó szempont. Az intratumorális lokális koncentráció emelése anélkül fokozná az antiproliferatív hatást, hogy a mellékhatások előfordulási gyakorisága növekedne. A glioblasztómás betegek kezelése során alkalmazott Stupp-protokollban az irradiáció fizikai hatásának tulajdonított átmeneti vér-agy-gát permeabilitás fokozódástól a magasabb intratumorális gyógyszerkoncentráció elérése várható. A kérdés az, hogy a TMZ orális bevitele és az irradiáció kivitelezése időben hogyan viszonyuljon egymáshoz a maximális hatékonyság elérése érdekében? Ehhez első lépésben egy megbízható gyógyszeranalitikai módszer kidolgozására van szükség, mely az igen alacsony koncentrációjú TMZ-t olyan, erősen komplex biológiai mintából, mint a humán szérum nagy biztonsággal detektálni képes.

A TMZ koncentráció meghatározása több nehézségbe ütközik, szérumbeli koncentrációja igen gyorsan változik, melynek időbeni lefolyását több paraméter is erősen befolyásolja. A TMZ lebontása elsősorban a pH-függő MTIC-é történő hidrolízisen keresztül megy végbe és a hepatikus metabolizmus csak kisebb szerepet tölt be. A TMZ savas pH-n stabil, viszont gyorsan lebomlik neutrális vagy bázikus környezetben [25]. Mivel a TMZ az antitumorális hatását a MTIC, mint degradációs termékén keresztül fejt ki, a MTIC plazma koncentrációjának monitorozása a TMZ adagolása során fontos lenne, annak érdekében, hogy hatékonyságát és farmakokinetikáját kiértékeljük [24].

Állandóan felmerülő kérdés a szakirodalomban, hogy a különböző gyógyszerek milyen lokális koncentrációt érhetnek el az agyállományban, ill. az agydaganatban, jelen esetben a glioblasztómában? Mivel a kezelés hatékonysága leginkább a tumorban megjelenő gyógyszer szinttől, a mellékhatások mértéke pedig a szisztémásan keringő hatóanyag-koncentrációtól, és végső soron e kettő érték egymáshoz viszonyított arányától függ, ezekre az adatokra égető szükség lenne. A kemoterápiás készítmények összehasonlításához, a legmegfelelőbb kiválasztásához az elérhető maximális intratumorális gyógyszerkoncentráció ismerete jelentős segítséget nyújtana, de erre vonatkozó irodalmi adatok eddig még nem születtek.

A klinikumban egyre nagyobb jelentőségre szert tevő kapilláris elektroforézis (CE) potenciálisan mindkét célra megfelel, így tanulmányainkat ezirányban is kiterjesztettük.

1.3. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) szerepe az asztrocitómákban

1.3.1. Az EGFR és az integrinek kölcsönhatásának szerepe az asztrocitómákban

A GBM gyakorlatilag mindig bekövetkező kiújulásáért nem csak a TMZ-vel szemben kialakuló rezisztencia, hanem a sugárterápia hatékonyságának mérsékelt jellege is felelőssé tehető. Korábban már a GBM radiorezisztenciájának hátterében számos mechanizmus felderítésre került, azonban a pontos molekuláris interakciók egy része még mindig ismeretlen. Ráadásul, a DNS károsodásra adott elégtelen válasz, a sejtfelszíni molekulák, köztük a növekedési faktor receptorok kóros együttműködése miatt kialakult szabályozatlan jelátvitel szintén fontos szerephez jut. Ebből kifolyólag a transzmembrán receptor tirozin kinázok ErbB családjának tagjait már részletesen tanulmányozták [26]. Az ErbB1 (EGFR-ként vagy HER1-ként is ismert) gyakori funkciószerző mutációja a malignus gliomákban már régóta ismert. Az ErbB receptor tirozin kinázok az ionizáló sugárzásokra adott válaszreakciókban és rezisztencia kialakításában vesznek részt [27], és az emelkedett ErbB1-szint csökkent radioszenzitivitással jár a magas grádusú asztrocitóma sejtekben [28]. Azt is kimutatták, hogy a tumorsejtek több, az ErbB családba tartozó olyan molekulát termelnek, amelyek homo- és heteroasszociálódhatnak a jelátviteli folyamatok során [29]. Az egyszeri és ismételt radiáció által kiváltott ErbB1 aktivációra fellépő citoprotektív és citotoxikus válaszok közötti egyensúly nagyban függ a különböző sejtfelszíni receptorok relatív expressziójától és aktivitásától [30].

Előzőek mellett, a tumoros sejtek túlélése és proliferációja nagyban függ a sejt és annak környezete közötti kölcsönhatástól, ezek között is elsősorban az extracelluláris mátrix-szal (ECM) való kapcsolattól [31, 32]. Újabb tanulmányok szerint ezek a funkcionális kapcsolatok bizonyos sejt adhéziós molekulák és a receptor tirozin kinázok (TK) között hozzájárulhatnak a kemo- és radiorezisztencia kialakításához [33, 34]. Az egymással asszociálódott receptor TK-k és sejtadhéziós molekulák koaktivációja redundáns szignálokat küld a citoplazmába és ezzel befolyásolja a sejtek válaszát a célzott terápiákra [35–38]. Az integrinek (pl. $\alpha 5 \beta 1$ heterodimer) fokális adhéziós komplexekben különböző fehérjékkel alkotnak multimer clustereket és olyan szignálokat küldenek, amelyek megakadályozzák az apoptosist [39, 40]. Az ErbB1 integrin- $\beta 1$ -el történő kölcsönhatása révén a tumorsejtek leválását, migrációját és metasztatikus képességét is elősegíti azáltal, hogy az integrin- $\beta 1$ citoplazmatikus részéről leválasztja a tenzin-3-at, így a citoszkeletális aktin rendszer destrukturalódását okozza [41, 42].

Továbbá, a legfrisebb tanulmányok azt bizonyítják, hogy az integrin- $\beta 1$ inhibitorok, mint radioszenzitivizáló ágensek ígéretesek lehetnek a glioblasztómák kezelésében. Következés-

képpen az ErbB1 és integrin- β 1 kölcsönhatása fontos szerepet játszhat a fokozott radiorezisztencia kialakulásában, új terápiás targetként szolgálhat. Így ezen interakciók mind inkább a figyelem középpontjába kerülnek az *in vitro* és a xenograft modellekben megszerzett eredményekre támaszkodva. Fontos azonban az is, hogy az ErbB és integrin molekulák interakciója és expressziós szintje különbözik egyedi *in situ* glioblasztómák esetében, tehát így megjósolhatják a terápia hatékonyságát, a betegség kimenetelét is.

1.3.2. Az EGFR mutáció szerepe glioblasztómákban

A leggyakoribb genetikai eltérés a GBM-ban az EGFR gén amplifikációja, amely az EGFR, egy transzmembrán TK receptor fokozott expresszióját okozza [43]. Az EGFR gyakran mutált illetve gyakorta felülexpresszált más humán malignitások esetében is, ami általában agresszív viselkedéssel társul [44].

Korábban az EGFR kináz extracelluláris doménjének delécióját tekintették a leggyakoribb EGFR mutációnak a különböző tumor típusokban, egészen a nem kissejtes tüdőrákban (*non-small cell lung cancer, NSCLC*) az EGFR kinázt érintő szomatikus mutáció felfedezéséig [45, 46]. A legismertebb mutáció az EGFR III-as variánsának deléciója (EGFRvIII, delta 801EGFR, del2-7 EGFR), amely az extracelluláris domén 2-7 exonjainak (801bp) *in frame* delécióját jelenti - ezt a GBM genomjának szintjén is azonosították. A 2-7 exonok *in frame* deléciója aktiváló hatást fejt ki a receptorra a sejtek számára proliferatív előnyt biztosítva [47, 48].

A gefitinib és az erlotinib olyan szelektív EGFR tirozin-kináz inhibitorok (TKI), melyek az eddigi klinikai tanulmányok szerint a tüdőrákos betegek egy kis csoportjában megfelelő terápiás választ eredményeznek. A betegek reakciója a célzott EGFR antitumorális kezelésre összefüggésben lehet egy szomatikus-aktiváló mutációval, amely az EGFR gént érinti. A leggyakoribb EGFR mutációk a négy konzervatív aminosav reziduomot tartalmazó rész deléciója a 19-es exonban illetve a 21-es exonban lévő L858R pontmutációja [49, 50].

A legjobb bizonyítéknak az EGFR szerepére glioblasztómákban, azok a klinikai eredmények számítanak, melyek szerint a rekurrens glioblasztómával küzdő betegek 15-20 %-ában a kis molekulású EGFR TKI-k szignifikáns tumor regressziót értek el. Részletesebb vizsgálatok azonban sajnos azt igazolják, hogy az EGFR kináz doménban lévő mutációk nem jósolják meg a glioblasztómák érzékenységet az EGFR kináz inhibitor terápiára [51, 52].

Mivel a standar terápia részét képező TMZ mellett új készítmény alkalmazása csak progrediáló tumorokban engedélyezett, ezért a TKI-ok hatékonyságát prognosztizáló EGFR

mutáció analízis elsősorban a kiújult tumorok esetében bír klinikai jelentőséggel. Ebben a betegpopulációban azonban még kevés ezirányú vizsgálat született, mert a recidív GBM-ra az esetek többségében újabb műtéti kezelés nem javasolható, így az analizálható tumorszövet gyűjtése is nehézségekbe ütközik.

1.4. A gliómák és az extracelluláris mátrix

Mivel a sejtosztódást gátló antiproliferatív hatásmechanizmusú kemoterapeutikumok hatékonysága kitartó próbálkozások ellenére sem érte el a kívánt szintet, határozott igény jelentkezett egyéb támadáspontú készítmények kifejlesztésére. Tekintve, hogy mind a sugárterápia, mind pedig a műtéti kezelés hatékonyságának leginkább az agydaganatok invazivitása szab korlátokat, az intracerebrális tumorok környezeti infiltrációs képességének megismerése és befolyásolása az utóbbi időkből egyre gyakrabban vált a neuro-onkológiai kutatások célpontjává. A tumoros invázió folyamatának megértéséhez a tumorsejtek és környezetük kapcsolatának közelebbi feltárása vált szükségessé.

A központi idegrendszer (KIR) sejtjeit a szervezet többi sejtjeihez hasonlóan a fehérjében és rostban gazdag ECM veszi körül. Összetételét illetően a mátrix rendkívül heterogén, döntően kollagéneket, elasztint, laminineket, fibronektint, proteoglikánokat (PG), glükózaminoglikánokat (GAG) illetve enzimeket tartalmaz. Felépítésére jellemző, hogy a különböző molekulák, enzimek és szolubilis faktorok kötőszöveti rostok hálózatába ágyazódnak [53–55]. Az ECM szövet-specifikus és dinamikus, aktív környezetet biztosít a sejteknek. Ez a szoros sejt-ECM kapcsolat különböző jelátviteli útvonalon keresztül meghatározó szereppel bír számos fiziológiai és patológiai folyamatban, mint például a sejtmozgás, differenciálódás, génexpresszió, hisztogenezis valamint a rosszindulatú daganatok terjedése [56–58].

A tumorsejtek inváziója során szoros kapcsolat alakul ki a sejtek és az ECM között. Ez a sejt-ECM konnexió a sejt-sejt interakcióval és a szolubilis faktorok rendszerével együtt egy komplex kommunikációs hálózatot hoz létre [59]. Az intrakraniális daganatokat igen jól lehet jellemezni eltérő invazív potenciáljaikkal, ami nagyban ECM függő [60–62]. A kifejezetten invazív malignus gliómák nagyban különböznek a csaknem gömb alakú agyi áttétektől és sokszor nehéz intraoperatív megkülönböztetni őket a peritumorális agyszövettől, melyet a gliómasejtek több centiméter mélyen infiltrálni képesek, ami radikális reszekciójukat eleve

lehetetlenné teszi [63, 64]. Másfelől pedig egy átlagos szoliter agyi áttét sebészi eltávolítása rutin idegsebészeti feladatnak számít. Úgy tűnik, az ECM-nek kiemelkedő szerepe van ebben az igen eltérő intenzitású invazív viselkedésben [65].

1.4.1. Az extracelluláris mátrix szerepe az invázióban

Ahhoz, hogy a gliómák invazív természetét megérthessük, át kell tekintenünk a peritumorális infiltráció celluláris és molekuláris történéseit. A tumoros invázió legfontosabb szereplője az ECM, mely a normál agyi térfogat meglehetősen nagy részét jelenti, hiszen az egészséges agyszövet térfogatának nagyjából 20%-a az extracelluláris tér. Az extracelluláris térfogat aránya azonban a primer agytumорок jelentős részében szignifikánsan megemelkedik, a teljes tumorszövet térfogatának mintegy 48%-át képviseli. Az agyszöveti ECM szerkezete és komponensei sokban eltérnek az egyéb szervekben megtalálható ECM felépítésétől. Az agyi ECM főként makromolekulákat tartalmaz, (GAG-okat és PG-eket) és csak kisebb részben vannak jelen a fibrilláris glikoproteinek (pl. kollagének, fibronectin, elasztin vagy retikulin). Az ECM-ban található glikoproteinek összetevői kulcsfontosságúak a peritumorális infiltrációban, hiszen a celluláris kitapadás és a migráció szerkezeti elemeit adják. Az invázió molekuláris mechanizmusainak feltárása végett kiterjedt kutatások irányultak a hialuronsav (hialuronán, HA), a PG-ok és különböző típusú GAG-ok jelenlétének és funkciójának vizsgálatára és több esetben állapítottak meg pozitív összefüggést egyes ECM alkotók és a malignus gliómák invazivitása között. A sejtek adhéziójához és migrációjához a sejtek felszínén lévő specifikus receptoroknak az ECM komponenseivel kell kapcsolatba lépniük. A sejtfelszíni receptorok közül kiemelendők az integrinek, a CD44 és a CD168. Bizonyos proteázok valamint szintetázok szintén erősen befolyásolják az invazivitást, ugyanis az ECM alkotóinak mikrolokális koncentrációját módosítani és/vagy a pericelluláris hálózatot emészteni képesek [61, 63, 66–75].

A gliómasejtek aktív mozgásukhoz az ECM makromolekuláinak segítségével beszűrik környezetüket és azt a tumoros szövethez hasonlóvá alakítják. A peritumorális invázió folyamata a tumoros sejtek és a nem-neoplasztikus sejtek, illetve az ECM konfrontációs zónájától függ. Míg a gliómasejtek főként adhéziós receptorokat és proteázokat expresszálnak, addig a szöveti sejtek olyan makromolekulák szintézisét segítik elő, amelyek az eredeti szerkezet fenntartásáért felelősek, illetve gátolják az inváziós sejtmozgást. Mivel az agyparenchymában az ECM-ben nincs fibrilláris jellegű, erős kötőszövetes szerkezetű,

kollagénben gazdag hálózat, az agyállomány lágy szöveti tulajdonságokkal bír, és ezért nem képes a tumorsejtek migrációjával szemben valódi ellenállást kifejteni. Ráadásul a gliasejtes tumorok esetében további két tényező segíti még elő a peritumorális beszűrődést. Az egyik ilyen tényező az, hogy az agy parenchymájának normál szerkezete nagyrészt a fehérállomány pályáiból és a bazális membránból áll, melyek alkalmasak arra, hogy a sejtek migrációját vezetni tudják. A másik infiltrációt segítő tényező a gliális sejtek specifikusan fokozott migrációra való képessége. Mindkét tényező az agyszövetre jellemző és a fejlődéstani, szerkezet és a funkció közötti kapcsolat ismeretével könnyen megérthető [76, 77].

Neuro-onkológiai szempontból a gliómasejtek fokozott motilitása, valamint a kifejezett peritumorális infiltráció az alábbi problémákhoz vezet:

- A. Mivel a gliómasejtek inváziója az alacsony grádusú tumorokban is megfigyelhető, még ezekben, az egyébként benignus jellegű tumorok esetében sem tekinthető a teljes eltávolítás egyszerűen kivitelezhető és kézenfekvő megoldásnak. Ez az oka annak, hogy az alacsony grádusú (II-es grádusú) tumorokat „semi-benignus” tumoroknak tartjuk. A tumor makroszkóposan teljesnek tűnő sebészi eltávolítása ellenére a recidívák aránya nagyon magas, a betegek teljes gyógyulása messze nem törvényszerű.
- B. Magas grádusú tumorok esetében sem nyitott műtéttel, sem pedig konformális radioterápiával, vagy sztereotaktikus pontbesugárással („gammakés”) sem lehet teljes tumoreltávolítást elérni. Érthető tehát, hogy miért találkozunk majdnem minden esetben a tumor lokális kiújulásával.
- C. A lokális kemoterápiás kezelésnek (intraparenchymális vagy műtét után alkalmazott intracavitális gyógyszerek) hatásfoka alacsony, hiszen a reszekciós üreg szélétől akár több cm-es távolságban is megtalálható infiltráló tumorsejtekre a helyi kezelés már érdemben hatást nem gyakorol.

1.4.2. A gliómák peritumorális inváziójának molekuláris megközelítése

Mivel laborvizsgálataink tárgyát az ECM tumorinvázióval összefüggésbe hozható molekulái képezik, részletes megismerésük kutatásunk alapját jelenti. A tumoros infiltráció sejtszintű eseményei igen összetett molekuláris folyamatok eredményeképpen valósulnak meg.

A tumorsejtek migrációjában szerepet játszó molekulákat három fő csoportra lehet osztani:

1. Sejtmembrán-asszociált molekulák (receptorok és adhéziós molekulák).
Főbb képviselőik:
 - integrinek
 - CD44
 - RHAMM (receptor for hyaluronate-mediated motility)
 - szindekánok
 - kadherine
2. ECM komponensek (a receptorok célmolekulái).
Főbb képviselőik:
 - glükózaminoglikánok (GAG-ok)
 - proteoglikánok (PG-k)
 - hialuronsav (HA)
 - fibronectin
 - lamininek,
 - agrin
 - tenaszcin
 - lektikánok (brevikán, neurokán, verzikán, stb.)
3. Az ECM komponenseit szintetizáló vagy lizáló enzimek.
Főbb képviselőik:
 - mátrix-metalloproteinázok (MMP-k)
 - katepszinek
 - hialuronsav szintetázok (HAS)

1.4.3. A tumorsejtek inváziójának folyamata

A primer agydaganatok inváziós hajlama régóta ismert tény, így a peritumorális beszűrődés molekuláris mechanizmusai már sok éve a neuro-onkológiai kutatások tárgyát képezik és néhány inváziós folyamatot már részletesen ismerünk. Általában a tumoros inváziót egy négylépéses modellel lehet leírni, mely az agytumорок esetében is alkalmazható. Ez a modell az alábbi lépésekből áll:

- 1) az invazivitás helyén a tumorsejtek leválnak az egyre növekvő primer tumoros sejthalmazról,
- 2) a levált sejtek specifikus receptoraik révén kapcsolódnak az ECM meghatározott komponenseihez,
- 3) a gliómasejtek által szekretált proteázok lokálisan bontják az ECM-et, a környező szövetben migrációs útvonalat alakítanak ki,
- 4) a tumorsejtek citoskeletális folyamatok segítségével aktív mozgásba kezdenek.

A peritumorális invázió minden egyes fenti lépése számos molekula összehangolt működését kívánja meg, melynek eredményeképpen a tumorsejt az alább részletezett aktív sejt szintű mozgás révén a normális agyparenchymába vándorol [78, 79].

1) A szöveti invázióban szereplő tumorsejtek primer tumorsejthalmazról történő leválása meglehetősen bonyolult folyamat és további lépésekre osztható:

- a) a primer tumor-sejthalmazt összetartó kadherin mediált sejtkapcsolatok destabilizálódása és szerkezeti felbomlása,
- b) a primer tumormasszához kapcsolódást biztosító további sejtdhéziós molekulák csökkent kifejeződése, mely a *gap junction* típusú sejt-sejt közötti kapcsolatok erős redukciójához vezet,
- c) végül a sejtet az ECM-hez kihorgonyozó CD44 enzimátikus bontása történik meg egy ADAM nevű metalloproteináz által [78–82].

2) A tumoros sejtek ECM-hez történő kapcsolódása specifikus sejt felszíni és transzmembrán receptorok révén történik meg, melynek egyik jellemző formája az integrinek kapcsolódása a lamininekhez, fibronectinhez és kollagénhez vagy a CD44 kötődése a HA-hoz.

3) Az ECM komponensek degradációja a proteázok, pl. MMP, hialuronidáz, katepszin és kondroitin-szulfatáz megemelkedett szintje és fokozott aktivitása révén jön létre.

4) A migráció során a glióma sejtek a környező ECM-mel állandó kapcsolatban állnak, ahol az ECM a sejtek számára egyrészt mechanikai barriert jelent, de a mozgó sejtek számára húzó kötődési struktúrát is képvisel. A sejtek morfológiája megváltozik a sejtmozgás alatt: a sejt polarizálttá válik, membrán kitüremkedések jelennek meg, a mozgás irányában állábak (*pseudopodium*-ok), továbbá *lamellipodium*-ok, *filopodium*-ok és *invadopodium*-ok alakulnak ki. A membrán-kitüremkedésekért felelős aktin filamentumok mellett egyéb szerkezeti és jelátviteli molekulák is aktiválódnak és citoszkeletális kontrakciók révén a membrán kihorgonyozódik, összességében a sejt előrehalad. Az ECM alkotók citoszkeletonhoz történő csatlakozását disztroglikánok biztosítják. A gliális sejtek mozgásában és összehúzódásában a miozin-II két izoformája (A és B) vesz részt. A miozin-II révén a glióma sejtek a magjuknál szűkebb pórusokon is képesek átjutni, ami azért fontos, mert az agyállományra kifejezetten szűk extracelluláris terek jellemzők [83, 84].

1.4.4. A gliómák inváziójában szerepet játszó extracelluláris mátrix komponensek vizsgálatának klinikai jelentősége

Közismert idegsebészeti tapasztalat és dilemma, hogy míg a gliómák radikális sebészeti megoldása az infiltratív növekedés miatt az esetek döntő többségében kivitelezhetetlen, addig a szoliter áttéti daganatok teljes eltávolítása általában rutin idegsebészeti beavatkozásnak minősül. Ez a megfigyelés a leggyakoribb, primer tüdőkarcinóma eredetű metasztázisok esetében is rendszeresen tapasztalható. A tüdőrák hematogén áttétképzésének leggyakoribb helye a KIR [85]. A betegség lefolyása során az esetek 40-65%-ában létrejön az agyi metasztázis [86], sőt, az esetek 9%-ában ez az egyetlen távoli szervi áttét. Valamennyi egyéb szervi daganat együttesen az esetek 8-10%-ában jár agyi áttéttel [87]. Az intracerebrális áttéti tumor radikális reszekábilítása nem utolsósorban annak a ténynek köszönhető, hogy az agyi áttétek növekedése nem, vagy csak minimális invazivitást mutat. A glióblasztóma és a tüdőrák áttét között tapasztalható jelentősen különböző reszekabilitást eredményező intracerebrális invázió oka döntően a két tumortípus extracelluláris mátrixának eltérő szerkezetében, az ott található makromolekulák mikrolokuláris expressziójában és tulajdonságaiban keresendő. Ha megismerjük az egyébként hasonlóan anaplasztikus, de jelentősen eltérő intracerebrális inváziót mutató daganatok peritumorális infiltrációjában látható különbségek okait, akkor a gliómák invazivitásának gátlására szolgáló eszközökhöz juthatunk. Ennek segítségével a műtéti reszekabilitás és a sugárterápia hatékonysága is jelentősen növelhető lenne.

1.5. Az anti-invazív terápia létjogosultsága

Jelenleg a primer agytumorsejtök kuratív onkoterápiája még nem ismert. Az intenzív sejtosztódás, a szignifikáns peritumorális beszűrődés és a fokozott angiogenezis együttesen felelős a gliómák kiemelkedően magas recidíva-arányáért. A nemrégiben bevezetett kemoterápiás szerek hatékonyságának átmeneti jellege miatt valószínűleg kombinációs terápia hozhatna javuló eredményeket. Ezért amellet, hogy nagy specifitású tumormarkereket keresünk, a gliómák invázójának molekuláris spektrumát is érdemes felderíteni. Emellet szól, hogy az invázióval összefüggésbe hozható molekulák mRNS expressziós szintje jellemző a különböző szövettani típusú tumorcsoportokra. Ezért az individuális kemoterápiához szükséges egyedi anti-tumor célpontok kiválasztásához a gliómák inváziós spektrumának meghatározása komoly segítséget nyújthat [88]. A tumorprogresszió összetettségéből fakadóan a gyógyszerkombináció már kiterjedhet az anti-proliferatív, anti-invazív valamint anti-angiogén

készítményekre is, melyek együttes hatásától az agytumорок onkoterápiájában új eredmények várhatók. A jelen disszertációban részletezett kutatások tárgyát képező peritumorális invázió gyógyszeres redukálása révén a reziduális vagy recidív daganat radikális műtéti eltávolításának esélyei egyértelműen javulnának, illetve a sugárkezelés (akár az FBRT, akár a stereotaxiás sugársebészet) kuratív jellege is felmerülhetne. Kutatásainkat ezek alapján egyrészt a jelenlegi onkoterápia ineffektivitása okainak feltárása, másrészt a peritumorális invázió molekuláris hátterének megismerése vezette.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A jelenlegi szerény neuro-onkológiai kezelési eredmények háttérének megismeréséhez és az onkoterápia hatékonyságának fokozása céljából kutatásainkhoz a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg.

1. Mivel minden vizsgálat saját beteganyagon történik, ezért első lépésben a Debreceni Idegsebészeti Klinikán kezelt betegek mintagyűjtését szükséges megszervezni. A szabályozott formában, etikai engedéllyel és kutatási célokra alkalmas szövetminták gyűjtése, tárolása és kezelése céljából Tumor- és Szövetbankot kell létrehozni. A glioblasztómás betegek klinikai paramétereinek feldolgozásával párhuzamosan adatbankot is érdemes kialakítani. Ennek segítségével meg lehet majd határozni a jelenlegi onkoterápia effektivitását és újra lehet értékelni a klinikai betegadatok prognosztikai szerepét valamint az idegsebészeti műtéti ellátás kiterjesztésének jelentőségét.

2. A betegadatok feltérképezése után a genetikai prognosztikai faktorok saját betegpopuláción megvalósuló klinikai relevanciájának meghatározását és az 1p19q kodelíció vizsgálati eredményeinek és onkoterápiát befolyásoló prediktív szerepének elemzését tűztük ki célul.

3. A klinikai adatok elemzését követően a primer malignus agydaganatok kezelésében bázisterápiának számító TMZ mérsékelt hatékonyságának okait célszerű meghatározni. Ehhez elengedhetetlenül szükséges a TMZ sérumbeli aktuális koncentrációja rutinszerű kimutatásának és intratumorális koncentrációja objektív meghatározásának technikáját kidolgozni. Ennek során a GBM kezelésének konkuráló fázisában *per os* adott TMZ sugárterápiához viszonyított optimális időbeni alkalmazására tudnánk javaslatot tenni, és célkitűzés az irodalomban még nem szereplő, humán glioblasztómában kemoterápiás készítmény intratumorális koncentrációjára vonatkozó objektív adatot szolgáltatni.

4. Miután megállapítottuk a jelenlegi onkoterápia korlátainak egyes fő tényezőit, a glioblasztómás betegek sugár- és kemoszenzitivitására utaló prognosztikai faktorok meghatározása a cél. A korábbi eredmények alapján e szempontból ígéretesnek tűnő EGFR és integrin expresszió szerepének vizsgálatát tekintettük feladatunknak. Egyrészt a két célmolekula sejtfelszíni asszociációjának asztrocitómákra vonatkozó prognosztikai

jelentőségének megítélése, másrészt a TKI-ok GBM kezelésében várható potenciális effektivitását előrevetítő EGFR amplifikáció és mutáció meghatározása a kutatásunk célja.

5. Megértve a kemo- és sugárterápia effektivitásának korlátait, a gliómák műtéti reszekábilítása molekuláris hátterének vizsgálatát tűztük ki célul. Ehhez elsősorban az invázióban szerepet játszó ECM komponenseket kell azonosítani, majd a környező agyállományt különböző mértékben infiltráló tumorok (intracerebrális metasztázis *versus* glióma) inváziójának elemzését foglalmaztuk meg teendőként. Kérdésünk, hogy milyen molekuláris mechanizmusok állnak a különböző szövettani besorolású, de egyaránt anaplasztikus intracerebrális daganatok igen eltérő mértékű inváziója mögött?

6. Felismerve a GBM kezelési kudarcának egyik fő okaként szerepeltethető kiterjedt peritumorális inváziót, ezen a vonalon tovább kutatva elemeznünk kell a konkuráló kemo-irradiáció gliómák invazivitására gyakorolt hatásának molekuláris szintű manifesztációit kezelés előtti és kezelés utáni GBM mintákon. Kérdésünk, hogy a jelenlegi onkoterápia elősegíti-e a kiújuló GBM műtéti reszekábilitását, azaz van-e kimutatható inváziót gátló hatása?

7. A gliómák peritumorális inváziójának közelebbi megismeréséhez a tumort befogadó környező agyállomány szerepével kapcsolatban merülnek fel kérdések. Így folytatva a különböző eredetű anaplasztikus daganatok (pulmonális adenokarcinóma agyi áttéte *versus* GBM) eltérő mértékű inváziója magyarázatának kutatását, a peritumorális agyállomány tumoros infiltrációval kapcsolatban fellépő védekező reakcióinak feltárását is célkitűzéseink közé soroltuk. Ezáltal az irreszekábilitást eredményező tumorinvázió mindkét oldalának résztvevőjét vizsgálva lehet a folyamatról egységes képet alkotni és tumor-specifikus személyre szabott onkoterápiához új adatokat szolgáltatni.

8. Mivel GBM esetében a hosszútávú túléléshez szükséges teljes műtéti eltávolítás a peritumorális invázió miatt nem kivitelezhető és a mindig bekövetkező lokális recidiváért is ez tehető felelőssé, az inváziós molekuláknak a várható túlélésre gyakorolt hatása nem kérdéses. Ennek a megfigyelésnek az objektív meghatározásához azt szükséges megvizsgálunk, hogy az invázióban szerepet játszó ECM alkotók expressziója milyen összefüggést mutat a glioblasztómás betegek túlélésével, és ez GBM esetében új prognosztikai faktornak minősíthető-e?

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A Debreceni Neuro-onkológiai Labor kialakítása

3.1.1. Szervezeti háttér

A jelen MTA doktori disszertációban szereplő tudományos eredmények mindegyike a Debreceni Egyetem Klinikai Központ (DE KK) Idegsebészeti Klinikán kezelt betegek klinikai paramétereinek, tumor- és szövetmintáinak feldolgozásából származó közleményekre épült. Ezeket a kutatásokat az DE KK Idegsebészeti Klinikán működő Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank által nyújtott lehetőségek alapozták meg.

Az Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank (a továbbiakban Agydaganatbank) Dr. Klekner Álmos korábbi neuro-onkológiai kutatási eredményeire benyújtott OTKA pályázat anyagi támogatásának köszönhetően 2005-ben jött létre. Az Agydaganatbank működéséhez a mintát a Kölni Idegsebészeti Klinikán működő Neuro-onkológiai Laborban található hasonló tumorbank adta, ahol a pályázó 1 éves német akadémiai ösztöndíjjal (*Deutsche Akademische Austauschdienst*, DAAD) eltöltött kutatómunka során ennek működési feltételeiről részletes ismereteket szerzett. Az OTKA keretből beszerzett nagy kapacitású ultramélyhűtő, a mintafeldolgozáshoz szükséges folyékony nitrogén kezelésére alkalmas tartályok, az intraoperatív mintagyűjtés kidolgozása, a szövetminta archiválás meghatározása, a klinikai adatgyűjtés megszervezése, ennek tárolása és a minta- valamint betegadatbank szintézise eredményezte azt a nélkülözhetetlen tudományos háttérrel, melyre azóta is kutatások sora épül. Az Agydaganatbank az első perctől kezdve TUKEB engedéllyel rendelkezik, melyet kétfévente beszámoló alapján hosszabbít meg az illetékes Bizottság.

Az Agydaganatbank működésének szervezeti keretét az e célból szintén 2005-ben megalakított Neuro-onkológiai Labor alkotja, melynek fő feladata a Bank nyújtotta lehetőségek tudományos kutatások céljaira történő felhasználásának elősegítése és kivitelezése. A Neuro-onkológiai Labort megalakulása óta Dr. Klekner Álmos vezeti, és működéséhez több kutatási pályázat biztosította és biztosítja ma is az anyagi háttérrel. Az Agydaganatbanknak köszönhetően ma már a jelen disszertációban összefoglalt saját kutatások mellett igen jelentős hazai és nemzetközi kollaborációban megvalósuló tudományos eredmények is születtek.

3.1.2. Az Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank jelentősége

Az Agydaganatbank egyrészt intraoperatív gyorsfagyasztott szövetminta-gyűjtést végez, de emellett egyéb humán szövetminták (likvor, nyál, bronchusváladék, vér) gyűjtését és mélyfagyasztott állapotban történő tárolását is megvalósítja. Az intraoperatív mintagyűjtésnek kiemelkedő előnye, hogy a lefagyasztott szövetminták később nem csak morfológiai vizsgálatokra, molekulák mennyiségi analizisére, hanem funkcionális vizsgálatok céljára (elsősorban enzimaktivitás meghatározására) is alkalmasak maradnak (szemben pl. a formalin fixált mintákkal). További előny, hogy a rutinszerű mintagyűjtés (a DE KK Idegsebészeti Klinikán majdnem minden nap történik mintagyűjtés) egyrészt a ritka tumorokból évek során nagyszámú mintakollekció létrejöttét eredményezi, másrészt a kiújult daganatokból származó szövetminták vizsgálatával a különböző onkológiai kezelések hatásainak molekuláris szintű meghatározása is megvalósítható. Az Agydaganatbank mintagyűjtési stratégiája ezáltal horizontális és vertikális mintagyűjtési célokat valósít meg. A minél többféle szövettani típusú daganatból származó mintagyűjtés a teljes tumorpaletta lefedésének igényével horizontális síkban eredményez nagyszámú mintagyűjtést, míg az egyes betegek időbeni követésével megvalósuló mintagyűjtés vertikális adatkapcsolási lehetőséget valósít meg.

Külön kiemelendő jelentőségű, hogy az Agydaganatbankban az idegsebészeti műtétek során elkerülhetetlenül eltávolításra kerülő, egyébként nem tumoros agyszövetek is tárolásra kerülnek. Ezekben az esetekben elsősorban a funkcionális idegsebészeti műtétekből (pl. epilepszia-sebészet) származó mintákat gyűjtjük, de a beékelődés elhárítását célzó *uncus gyri hippocampi* vagy *tonsilla cerebelli* eltávolítása, illetve alkalmanként a frontális vagy temporális polus reszekció is felbecsülhetetlen értékű mintagyűjtésre ad alkalmat. Ennek köszönhetően alakult ki ugyanis egy nem-tumoros, számos szempontból normálisnak tekinthető agyszövet-gyűjtemény, mely nemzetközi szinten is egyedülálló és minden tumorszövetet célzó tudományos kutatáshoz referenciaszövetként funkcionáló mintákat szolgáltat.

Az Agydaganatbank emellett számos, a későbbi szövettani feldolgozás során un. peritumorális agyszövetnek bizonyult szövetmintát is tartalmaz, mely műtét során ugyan tumornak tűnik, és az anatómiai szituációból adódóan a tumormmal együtt eltávolításra kerül (frontális, temporális pólus, hippocampus), de nem tumorszövet alkotja. Ezek a szövetminták a peritumorális reakciók és invazív folyamatok vizsgálatához jelentenek pótolhatatlan vizsgálati anyagot.

Az Agydaganat- és Szövetbankban tárolt, célzottan gyűjtött bronchusváladék és nyálminták az intravénásan alkalmazott gyógyszerek (elsősorban antibiotikumok)

szekréciójának és lokális koncentrációjának, azaz az intraorális és pulmonális effektivitást meghatározó minimális inhibitorikus koncentráció meghatározásához szükségesek.

További fő szövetmintagyűjtemény a tumoros betegektől származó teljes vér- és szérumgyűjtemény, mely egyrészt a tumoros betegek genomikai vizsgálatát, másrészt a tumorból származó és a vérkeringésbe került derivátumok (pl. mikro-RNS, mikroszómák) izolálását és analízisét teszi lehetővé. A horizontális és vertikális mintagyűjtési metódus ezekben az esetekben is megvalósulhat és igen jelentős kutatási potenciált hordoz magában.

3.1.3. Az Agydaganatbank gyakorlati működése során kifejlesztett saját technikák

1. A tumorminták mélyfagyasztott tárolása után történő mintafeldolgozás a minták felolvasztásával jár, így a több különböző, időben is elkülönülő vizsgálatokhoz való mintafeldolgozás során az eredeti minta minőségi romlása következhet be. A Debreceni Agydaganatbank esetében a mintatárolási procedúrába beépítettünk egy előzetes mintadarabolási lépést, amikor a folyékony nitrogénben lefagyasztott mintát a nitrogénben tördelve darabokra, az így keletkezett darabokat egyenként külön eppendorf tubusokban fagyasztjuk le. Ezáltal minden vizsgálathoz egy kis mintadarabot tartalmazó külön tubust veszünk elő az ultramélyhűtőből, és elkerüljük az eredeti minta darabolásával járó felolvadási és mintavesztési kockázatot.
2. A folyékony nitrogénben történő szövetminta-fagyasztás már régen bevált mintatárolási módszer, melynek azonban nem csak előnyei, hanem hátrányai is vannak. A folyékony nitrogénbe helyezett szövetminta körül ugyanis a nagy hőmérsékletkülönbség miatt a nitrogén forrni kezd, és számos mikrobuborék képződik, melyek mechanikai hatása a szövetmintát károsítani képes. Ennek elkerülésére különböző médiumokban történő fokozatos lefagyasztás technikái már kidolgozottak tekinthetők (pl. izopentán), de ezeknek sem rutinszerű technikai kivitelezése (nehezen várható el a műtőszemélyzettől az ehhez hasonló összetett mintapreparálási technikák alkalmazása), sem pedig gazdasági vonatkozása nem tette vonzóvá az egyébként valóban ajánlatos módszert. A Debreceni Agydaganatbank gyakorlatában sikerült kidolgozni egy olyan módszert, mely kihasználja ugyan a folyékony nitrogén adta fagyasztási lehetőségeket, mégsem jár szövetroncsoló jellegű buborékképződéssel. A mi gyakorlatunkban alufóliával bevont parafaszigeteket használunk, melyek szabadon úsznak a folyékony nitrogén felületén. A fémtartalmú bevonatnak köszönhetően a szigetek felszínének hőmérséklete

gyakorlatilag megegyezik a nitrogénével, így a ráhelyezett friss szövetminta azonnal átfagy – anélkül azonban, hogy forrásból származó mechanikai hatással számolni kellene. A módszer további előnye, hogy a fémtermoszban lévő nitrogén felszínén úszó alufóliázott szigeteket filctollal több mezőre lehet osztani, mely így az előzetes mintaszелеkciót is lehetővé teszi, és az egy műtét során vett többféle szövetminta (pl. tumor, ép, centrális régió, tumorperiféria) biztonsággal elkülöníthető és nem áll fenn annak a veszélye, hogy a termoszba ejtett minták később összekeveredhetnek.

3.2. A jelenlegi onkoterápia effektivitásának meghatározása glioblasztóma esetében saját beteganyagon

A glioblasztómás betegek nemzetközi szinten 2006-ban bevezetett kezelési protokollja a kemoterápiás készítmények rutinszerű alkalmazásával jelentősen javított a túlélési adatokon. Felmerült tehát az igény a betegek kezeléstől függő túlélési esélyeinek összehasonlítására, valamint az idegsebészeti, klinikai szempontból meghatározható prognosztikai paraméterek újrabecslésére. Továbbá felmerül a kérdés, hogy a szisztémás hatású kemoterápiás készítményekkel elért eredmények megváltoztatják-e a műtéti radikalitás kedvező hatását feltételező teljes tumorexstirpációra való törekvést? Az onkoterápia hatékonyságának ismeretében ártértékelődik-e bizonyos klinikai paraméterek prognosztikai jelentősége?

A Debreceni Idegsebészeti Klinikán szintén 2006-ban került bevezetésre glioblasztómás betegek kezelésére a TMZ rutinszerű alkalmazása. A konkuráló kemo-irradiáció és a TMZ monoterápia ellenére kiújult tumor esetében pedig 2009 óta alkalmazzuk a bevacizumab monoterápiát. Jelen vizsgálatban a különböző kezelési metódusok (hagyományos irradiáció, konkuráló kemo-irradiáció, kiegészítő bevacizumab kezelés) hatékonyságát elemeztük a klinikai paraméterek túlélést befolyásoló szerepének tükrében saját beteganyagon.

Vizsgálatunkban 104 olyan agydaganatos beteg adatait dolgoztuk fel, akiknél 2002 és 2012 között GBM miatt a Debreceni Egyetem Klinikai Központ (DE KK) Idegsebészeti Klinikáján műtét történt. A posztoperatív terápia alapján a 104 páciens öt csoportba osztottuk.

1. Az első csoportba tartozó 15 betegnél az igen rossz Karnofsky pontszám (KPS érték) alapján műtét után sem sugár-, sem kemoterápia nem történt (*best supportive care*, BSC).
2. Kilenc esetben a betegek a műtét utáni állapot alapján csak palliatív radioterápiában (pRT) (10x3 Gy) részesültek.

3. A harmadik csoportba 20 beteg tartozott, akik 2002-2005 között estek át műtéten és utána teljes dózisu sugárkezelésben részesültek, de kemoterápiát nem kaptak (30x2 Gy WBRT).
4. A negyedik csoportba azok a 2006-2008 között operált betegek tartoztak, akik műtéti eltávolítást követően konkuráló kemo-irradiációs kezelésben (Stupp protokoll szerint) részesültek (30x2 Gy FBRT + *per os* TMZ, + 6-12 ciklus (állapottól és radiológiai progressziótól függően) TMZ monoterápia, RT+TMZ). Ebbe a csoportba 35 beteg tartozott.
5. Az ötödik csoportba azokat a betegeket soroltuk (25 beteg), akiknél a Stupp protokoll után a daganat progrediált és ezt követően bevacizumab kezelésben részesültek (RT+TMZ+BC).

A feldolgozás során figyelembe vettük a betegek korát, nemét, a tumor oldaliságát, lokalizációját, legnagyobb átmérőjét, a műtét előtti és utáni KPS-t és a műtéti beavatkozás kiterjesztettségét. Ez utóbbit 3 típusba soroltuk: 1. biopszia, 2. részleges reszekció, 3. makroszkóposan teljes reszekció.

Munkánk során az egyes klinikai paraméterek és különböző kezelési módszerek túlélésben játszott szerepét vizsgáltuk.

A tumor oldaliságának szerepét aránybecsléssel vizsgáltuk, a pre- és postoperatív KPS-t, a progresszió előtti, utáni illetve OS szignifikáns voltát kétmintás t-próbával illetve Mann-Whitney próbával ellenőriztük. A két túlélési csoportban a betegek nemének, a különböző műtéttípusok illetve a tumorok lokalizációjának arányait aránybecsléssel vizsgáltuk. Statisztikai számításaink során minden alkalommal 5%-os szignifikancia szintet alkalmaztunk.

3.3. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagon: az 1 p19q kodeláció klinikai relevanciája oligodendrogliómákban és oligoasztrocitómákban

A Debreceni Egyetemen 2006-tól érhető el az 1p19q kodeláció rutinszerű vizsgálata, mely klinikai jelentőségének megítéléséhez minimálisan szükséges 2,5 év átlagos követési idő adatait elemeztük 2006 és 2008 között összesen 28, klinikánkon kezelt oligodendroglioma komponensű tumoros beteg esetében. Vizsgáltuk a kodeláció és a PFS összefüggését a terápia függvényében, majd eredményeinket összehasonlítottuk a nemzetközi irodalomban található adatokkal. Ezek mellett számos további klinikai paraméter és az 1p19q státusz összefüggéseit elemezve kerestünk klinikai relevanciájú következtetéseket.

A betegek klinikai adatait az 1. táblázat tartalmazza. 2006 és 2008 között összesen 28, a DE KK Idegsebészeti Klinikán operált beteg esetében történt a műtét után rutinszerű 1p/19q-kodeláció meghatározás. 9 II-es grádusú oligoasztrocitómás, 10 II-es grádusú oligodendrogliómás, 3 III-as grádusú oligoasztrocitómás és 6 III-as grádusú oligodendrogliómás beteg klinikai adatait vetettük össze a genetikai vizsgálat eredményével.

Szövettan		Átlagéletkor	46±14	Posztoperatív kezelés		Lokalizáció	
oligoasztrocitóma	12	grade II.	44±13	BCNU	2	grade II.	
grade II.	9	oligoasztrocitóma	35±80	PCV	7	bal	11
grade III.	3	oligodendroglióma	51±13	sugárterápia	3	jobb	7
oligodendroglióma	16	grade III.	51±17	radio- és kemot.	8	kétoldali	1
grade II.	10	oligoasztrocitóma	56±90	nem történt	8	grade III.	
grade III.	6	oligodendroglióma	47±21			bal	2
						jobb	7
Nem		Műtéttípus	1p19q kodeláció				
férfi	14	totális reszekció	15	pozitív	14		
nő	14	parciális reszekció	7	negatív	14		
		biopszia	6				

1. táblázat. 28 oligodendroglioma komponensű tumoros beteg klinikai adata

Vizsgáltuk a daganat grádusa, a betegek neme, életkora, a műtét típusa, a tumor lokalizációja (féltekék, illetve lebenyek szerinti elhelyezkedés), valamint a szövettani típus és a tumor 1p/19q-kodeláció közötti összefüggéseket. Emellett tanulmányoztuk az 1p/19q-kodeláció recidívamentes túlélésre vonatkozó prognosztikai szerepét a különböző grádusú tumorok, illetve a különböző posztoperatív onkoterápiában részesült betegek vonatkozásában.

Az összehasonlítható számcsoportok eloszlását a Shapiro-Wilk-tesztel vizsgáltuk. Normál eloszlás esetén a szignifikáns különbségek meghatározásához a páros, illetve páratlan T-próbát, ellenkező esetben a Mann-Whitney-tesztet, illetve a Wilcoxon-tesztet használtuk. Szignifikánsnak a $p < 0.05$ értéket tekintettük.

3.4. A temozolomid vizsgálata glioblasztómában

3.4.1. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztómás betegben

A CE méréseinkhez két glioblasztómás beteg szérum mintáját (a vérmintákat az egyszeri 400 mg dózisú TMZ orális alkalmazása után 60 perccel vettük le) és nem tumoros betegek szérum mintáját alkalmaztuk (a minták a Debreceni Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbankból származtak, a mintagyűjtés a betegek beleegyezésével, aláírásával és etikai engedély alapján történt). Mindkét beteg részleges tumoreltávolítás, konkuráló kemo-irradiáció után állt és a TMZ monoterápiás fázisban napi 1x400mg *per os* gyógyszerbevitelben részesült, mely után 60 perccel történt a mintavétel perifériás vénából. A szérum mintákat centrifugálással nyertük (3000 rpm). Minden minta oldatot -80 °C-on tároltunk az analízisig, majd 0,45 µm-es fecskendőszűrőn szűrtük, és további mintaelőkészítés nélkül injektáltuk a kapillárisba.

Méréseinkhez választott CE készülék egy HP3D CE modell volt (Agilent, Waldbronn, Germany). A minták injektálására minden mérés esetében hidrodinamikusan mintabevitelt (50mbar, 2s) alkalmaztunk. A mintaoldatokat a kapilláris anódos végénél juttatuk be. A szeparációt 68cm x 50µm belső átmérőjű polyimidréteggel ellátott kvarckapillárisban végeztük (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA). A kapilláris effektív hosszúsága a szokásos módszerű injektálásnál 60 cm, az ún. "short end" injektálásnál pedig 8 cm volt). Az alkalmazott feszültség 25 kV volt. A vizsgálatot diódasoros fotometriás detektálással végeztük 200 nm, 214 nm, 260 nm és 325 nm hullámhosszakon. Az elektroferogramokat a ChemStation számítógépes program 7.01-es verziójával (Agilent) rögzítettük és dolgoztuk fel. A stabilitási vizsgálatok elvégzésére a CE készülék automatikus mintainjektáló/elemző rendszere volt segítségünk.

Az analitikai elválasztáshoz használt pufferelektrolitok összetevői közül a nátrium-dihidrogén-foszfát, a dinátrium-hidrogén-foszfát, a HCl, a NaOH és a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) a Reanalból (Magyarország) származtak. A 180 µg/mL törzsoldatot TMZ (Temodal 20 mg, Schering-Plough, Magyarország) vízben történő feloldásával készítettük.

A kapillárisokat puffer elektrolittal 5 percen keresztül előkondicionáltuk: 1 M NaOH-al (10 perc), 0,1 M NaOH-al (10 perc), vízzel (5 perc) és pufferrel (20 perc) mostuk. A szérum minták analízise esetén utókondicionálásként 0,5 M NaOH-ot (3 perc), 0,3 M SDS-t (3 perc) és puffert (3 perc) alkalmaztunk, hogy eltávolítsuk az összes lehetséges adszorbeált anyagot a kapillárisról. A CE analízis előtt az összes puffert 0,45 µm-es szűrőn filtráltuk és hűtőben + 4 °C-on tároltuk.

Mivel a TMZ és bomlástermékei minimális töltéssel rendelkeznek, a micelláris elektrokinetikus kromatográfiát (MEKC) használtuk arra, hogy elválasszuk őket egymástól és a neutrális komponensektől. 20 mM alatti SDS tartalmú elektrolit esetében a neutrális komponensek közötti elválasztás nem volt elérhető, viszont 100 mM SDS tartalmú puffer elektrolit alkalmazásával nagyon jelentős hőtermelődést tapasztaltunk. Az optimális SDS tartalom a puffer elektrolit számára 40 mM-nak bizonyult. Az elektrolitok pH-ja illetve ionerőssége szinte egyáltalán nincs hatással a vizsgált komponensek effektív mobilitására, csak az elektroosmotikus áramlást (EOF) befolyásolta. Az analízis ideje pH 9-es értéken volt a legrövidebb, viszont a felbontás rosszabb volt, mint az alacsonyabb pH értékeken. Savas puffert alkalmazva az elektroforetikus futtatás során a TMZ degradációja nagyobb fokú volt. Az optimális pH érték a szeparáció számára 7-nek bizonyult, és ezen a pH-n elfogadható felbontást lehetett elérni és az analízis ideje is rövid maradt. A felbontás és a puffer ionerősségének összefüggését (5-100 mM foszfát) is vizsgáltuk, de utóbbinak számottevő hatása a szeparációra nem igazolódott.

A puffer koncentrációjának növelésekor a migrációs idő enyhén megemelkedett. 75 mM fölötti foszfát puffert használva (40 mM SDS a pufferben), az áramerősség 75 μ A lett, ami a csúcsok kiszélesedését okozta. A MEKC technika optimalizálása után a puffer elektrolit 25 mM foszfátot, 40 mM SDS-t tartalmazott pH 6,8-as értéken. Minden egyes komponenst a migrációs idejük és jellegzetes UV spektrumuk alapján azonosítottunk.

3.4.2. A temozolomid intratumorális koncentrációjának direkt meghatározása humán glioblasztómában

Az agydaganatmintákat jobb frontális rekurrens glioblasztómás beteg idegsebészeti műtété során szereztük be. A hullámozó panaszok miatt hospitalizált beteg TMZ monoterápiás kezelés alatt állt, de rapid állapotrosszabbodás követően sürgős műtetre került sor. Az utolsó TMZ adagját (400mg) a műtét előtt 1 órával vette be. A műtét során 3 daganatmintát (0,9915 g, 0,7803 g és 0,7647 g) és egy nem daganatos, normál agyi szövetmintát (peritumorális agyállomány a daganatot fedő frontális póluson, 0,3782 g) gyűjtöttünk 15 perces időintervallumokkal, majd a mintákat egyből folyékony nitrogén felszínén lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk az analízisig.

Az intratumorális gyógyszer szint vizsgálatához a szérumszint meghatározására is szükség volt. A glioblasztómás beteg szérum mintáit az egyszeri 400 mg dózisz TMZ orális alkalmazása után 30-250 perccel gyűjtöttük. Továbbá nem tumoros betegektől származó

szérum mintákat is alkalmaztunk kontrollként illetve a mátrix hatások tanulmányozásához. A mintákat tömény sósavval savanyítottuk 2 körüli pH-értékre (1 mL szérumhoz 10 µL tömény HCl-ot adtunk és összekevertük), hogy elkerüljük a TMZ hidrolízisét. Minden mintát -20 °C-on tároltunk az analízis előtt. A CE analízist megelőzően a szérum mintákat 15 percen keresztül 4 °C-on 9000 rpm-en centrifugáltuk.

A nem tumoros agyszövet- illetve tumormintákat liofilizáltuk, majd homogenizáltuk. Ezután a homogenizátumokat (0,0075-0,12 g) kis térfogatú (300-600 µL) 1M-os HCl-ban gondosan feloldottuk. A vizes oldat pH-ját az előkészítési folyamatok során erősen savas tartományban, 2 alatt tartottuk, hogy elkerüljük a TMZ hidrolízisét. Az így nyert sűrű, viszkózus oldatot lehűtöttük és 15 percen keresztül 4 °C-on 9000 rpm-en centrifugáltuk. A szupernatánst közvetlenül a CE eszközbe injektáluk. Az elődúsításhoz a felülúszóból 50 µL térfogatot extraktáltunk 3x 300 µL etil-acetáttal (10 perc vortex-keveréssel). A mintákat -20 °C-on tároltuk az analízis előtt.

3.5. Az EGFR és az integrinek kölcsönhatásának szerepe asztrocitómákban

3.5.1. Az *ErbB1* (EGFR) és az *integrin-β1* közti molekuláris interakció vizsgálata asztrocitómákban

Intraoperatív friss fagyasztott II-es és IV-es grádusú asztrocitómák szöveti metszeteiről készültek fluoreszcencia energia transzfer (FRET) mérések konfokális mikroszkóp használatával. 10 db II-es grádusú asztrocitóma (életkor: 18-59 év, átlagos életkor 37,8 év, 5 férfi és 5 nő) és 10 db IV-es grádusú asztrocitóma (életkor: 42-73 év, átlagos életkor 61,4 év, 3 férfi és 7 nő) mintával dolgoztunk.

A szövetmintákat folyékony nitrogénben hűtött iso-pentánban (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) gyorsfagyasztottuk. A Tissue-Tek O.C.T.-be ágyazás után 15 µm széles metszeteket készítettünk a Shandon Cryotom rendszer segítségével (AS-0620E, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA) -20 °C-on. A szilánnal burkolt tárgylemezre helyezett metszeteket szárítottuk és 4%-os PFA-PBS-ben 30 percig fixáltuk, majd 1%-os BSA-PBS-ben 30 percen át blokkoltuk. Ezután 20 µg/mL Cy3 konjugált anti-ErbB1 antitesttel (Mab528) és 20 µg/mL Cy5 konjugált anti-integrin-β1 antitesttel (TS2 klón) jelöltük egy éjszakán át 4 °C-

on inkubálva, majd 3x mostuk és glicerolban montíroztuk. A hisztológiai meghatározás rutin patológiai vizsgálat során történt.

Antitestek

Az ErbB1 és integrin- β 1, elleni antitesteket hibridóma sejtvonalak szupernatánsaiból nyertük: 528 (IgG2a, #HB-8509), TS2/16.2.1 (IgG1, #HB-243, ATCC, Manassas, VA) Sepharose 4B Fast Flow Protein G gyöngyök segítségével az IgG2a esetében és Protein A gyöngyökkel az IgG1 esetében (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Az antitestek jelölése Cy3, és Cy5 (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Németország), festékekkel történt.

A sejtek antitesttel való jelölése

A mikroszkópos mérésekhez, a LabTek II fedőlemezeihez tapadt sejteket (Nalga Nunc International, Rochester, NY) 3x mostuk PBS-ben majd az X-FITC, Cy3 vagy a Cy5-tel konjugált antitestek telítő koncentrációval jelöltük jégen, 30 percen át. Ezután 3x PBS-ben mostuk és 500 μ L 4 %-os formaldehid-PBS-ben fixáltuk 20 percen keresztül.

Konfokális mikroszkópiához egy Zeiss LSM510 CLSM (Carl Zeiss, Jena, Németország) készüléket alkalmaztunk Plan-Apochromat 63x/1.40NA olaj immerziós objektívvel és egy UV/488/543/633 sugárelosztóval. Az X-FITC, Cy3 és Cy5 fluroforokat 488, 543, és 633 nm-en excitáltuk és 505–535 nm, 560–605 nm band pass, és 650 nm long pass szűrőkkel detektáltuk. 1-3 μ m vastag, 4x átlagolt optikai szekciókat (512 x 512 pixel 12 biten) képeztünk le multitrack módban, hogy a csatornák közötti interakciókat kiküszöböljük. A szöveti minták expressziós értékeinek meghatározására a képeket tile módban készítettük el.

Statisztikai analízis

Az analíziseket a SigmaStat 3.5.0.54 segítségével végeztük (Systat Software, Inc.). A II-es és IV-es grádusú asztrocitóma csoportokat kétmintás t-próbával vagy a normalitás hiányában Mann-Whitney teszttel vizsgáltuk, miután a normál eloszlást Kolmogorov-Smirnov szerint, Lilliefors' korrekcióval ellenőriztük. Kettőnél több, normál eloszlást mutató csoport esetén ANOVA analízist és post-hoc Tukey's tesztet alkalmaztunk. Az ErbB1 és integrin- β 1 expresszió és az ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociáció relapszus-mentes időre kifejtett hatását lépésenkénti többszörös lineáris regresszióval határoztuk meg. A fent említett paraméterek tumor grádusra vonatkozó prediktív erejét pedig lépésenkénti többszörös bináris logisztikus regresszióval állapítottuk meg. A tumor alcsoportok teljes és relapszus-mentes túlélését

Kaplan-Meier analízis segítségével vizsgáltuk. A statisztikai összehasonlítás illetve a szignifikanciaszint (p) becslése log-rank próbával történt.

3.5.2. Az EGFR mutáció szerepének vizsgálata rekurrens glioblasztómában

Betegek

A szövetmintákat a Debreceni Idegsebészeti Klinikán rekurrens GBM miatt operált betegek műtete során gyűjtöttük. Összesen 20 olyan beteg mintáin végeztünk méréseket, akik korábban már átestek műtéti tumor reszekción illetve legalább radioterápián majd ezután újult ki a daganatuk.

A kis molekulásúlyú EGFR kináz inhibitor adjuváns terápia hatásának megbecsüléséhez az EGFR gén protein kináz doménjének, az EGFR fehérje expressziójának, az EGFR gén amplifikációjának és mutációjának vizsgálatát végeztük el rekurrens GBM mintákon az alább részletezett módszerekkel.

Immunhisztokémia

Az EGFR fehérje immunhisztokémiai vizsgálatát monoklonális antitesttel végeztük (2-18C9 klón; PharmDx Kit, DAKO, Glostrup, Denmark) a gyártó előírásainak megfelelően. A tumorsejtek ≥ 1 %-ának membránfestődése jelentette a pozitív eredményt.

Fluoreszcens in-situ hibridizáció (FISH)

A szövetmintákból 4 mikrométeres metszeteket készítettünk, melyeket a hibridizáció előtt Paraffin Pretreatment Reagent Kit II-vel kezeltünk (Vysis, IL, USA). A FISH vizsgálatot Spectrum-Orange-val jelölt EGFR génpróbával és Spectrum-Green-nel jelölt 7-es kromoszóma centromer régiójára specifikus referencia próbával végeztük (Vysis). A metszetek kontúr-festését 15 ng/ml 4',6-diamino-2-phenylindole-al (Vysis) végeztük. A zöld és piros jeleket 60 tumoros sejtmagban számoltuk meg szöveti mintánként.

DNS izoláció

Formalin-fixált, paraffinba ágyazott szövetmintákból 10 μ m-es szeleteket vágunk eldobható pengéjű mikrotóm segítségével. A deparaffinizált szöveteket proteináz K-tartalmú pufferben reszuszpendáltuk és 60 °C-on 16 órán keresztül inkubáltuk, amíg a szövetek teljesen

szolubilizálódtak. A DNS tisztítását EZ1 Biorobot és EZ1 DNS Tissue Kit segítségével végeztük (Qiagen, Hilden, Germany).

Nested PCR és DNS szekvenálás

Nyolc pár, az EGFR gén 18, 19, 20 és 21 exonjaira specifikus primert alkalmaztunk a a nested polimeráz lánc reakcióhoz (nPCR). Az első PCR 100 ng templát DNS-t tartalmazott, 300 nM forward és reverz primert, 5 µl Expand High Fidelity PCR (Roche, Basel, Switzerland) mester mixet, 2.6 U Expand High Fidelity enzim mixet (Roche) és 200 µM-et minden dNTP-ből 50 µl térfogatban. A PCR-el első körben amplifikált mintákat egy második körös nPCR vizsgálatnak is alávetettük. A második PCR 3µl-t tartalmazott az előzőből és 300 nM forward és reverz primert, 5 µl Expand High Fidelity PCR (Roche) master mixet, 2.6 U Expand High Fidelity enzim mixet (Roche) és 200 µM-et minden dNTP-ből 50 µl térfogatban.

A PCR ciklusok paramétereit az első ciklus során 94 °C-os denaturáció jellemezte 2 percen keresztül, majd 35 ciklus következett 94 °C-on egyenként 15 másodperc időtartamban (denaturáció), majd 56 °C 30 másodpercig (hőkezelés) és 72 °C 1 percig (extenzió). A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk annak érdekében, hogy az egy szálú DNS jelenlétét igazolni tudjuk. A PCR termékeket a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) segítségével tisztítottuk meg. A tisztított DNS szekvenálását a BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével végeztük 20 ng PCR termék, 3.2 pmol forward vagy rezerv primer illetve összesen 20 µl térfogatban lévő 8 µl Terminator Ready Reaction Mix felhasználásával. A szekvenálást követő DyeEx 2.0 Kit-el (Qiagen, Hilden, Germany) elvégzett tisztítás után az elektroforézist illetve az adatelemzést az ABI 310 Genetic Analizátor (Applied Biosystems) segítségével végeztük el.

3.6. Agyi áttéti daganat és gliómák invazivitásának összehasonlítása

Betegek

Szövetmintáink a Debreceni Idegsebészeti Szövet- és Agydaganatbankból származtak: műtét során a daganat széli részéből eltávolított és folyékony nitrogén felszínén azonnal lefagyasztott majd -80°C-on tárolt mintákon végeztünk méréseket. A vizsgálatokhoz csak a terápiás célú beavatkozások során eltávolított szövetmintákat használtuk, így a beteg számára semmilyen, a rutin kezeléstől eltérő kockázat nem keletkezett. Tekintettel az anaplasztikus

daganatok heterogén jellegére a vizsgálatok során minden fagyasztott tumordarabból szövettani metszetet is készítettünk a szövettani mikrolokális diagnózis megerősítéséhez.

A célkitűzésekben megfogalmazott kérdések megválaszolásához négy fázisban végeztük el méréseinket. Az egyes fázisban vizsgált szövetminták és molekulák listáit a 2. táblázatban foglaltuk össze. Az első fázisban az irodalom áttekintése alapján összeállítottuk azoknak a molekuláknak a listáját, melyek a peritumorális invázióban szerepet játszhatnak (3. táblázat). Ezeknek a géneknek az mRNS expresszióját meghatároztuk 5 GBM, 5 peritumorális normál agyszövet és 5 tüdő adenokarcinóma intracerebrális áttétből származó szövet-mintában. Ezután az mRNS expressziós értékeket a különböző szövettani csoportok között összehasonlítva meghatároztuk azoknak a molekuláknak a körét, melyek szignifikáns eltérést mutatva a nagyobb esetszámú vizsgálatokhoz további mérések céljára érdemesnek találtunk.

Az előzetes mérések alapján az egyes tumorcsoportok nagyobb számú analíziséhez összeállított molekulák listáját inváziós panelnek neveztük el. Konkrét, publikálásra érdemes eredményeink már ennek a célzottan összeválogatott inváziós panelnek a mérési eredményeiből születtek.

Fázis	Célmolekulák száma	Szövettani típusok és mintaszám		Immunhisztokémiával vizsgált molekulák
1.	96	5 5 5 5	GBM MET NORM	-
2.	23	4 4	GBM MET	neurokán, verzikán, szindekán, MMP-2, 9
3.	30	11 10 9	GBM MET NORM	agrin, neurokán, szindekán, verzikán, hialuronsav, MMP-2, -9
4.	26	9 10 8 9	A-II MET SCH NORM	brevikán, neurokán, tenascin-C, verzikán

2. táblázat. A különböző eredetű intrakraniális daganatok invázióban szerepet játszó extracelluláris mátrix-molekulák meghatározásának fázisai. GBM = glioblasztóma, MET = tüdő adenokarcinóma agyi áttéte, NORM = nem tumoros (peritumorális) agyállomány, A-II = II-es grádusú asztrocitóma, SCH = schwannoma, MMP = mátrix metalloproteináz

A második fázisban az előzetes mérések alapján megállapított inváziós panelt vizsgáltuk 8 szövetmintán: 4 GBM és 4 tüdő adenokarcinóma agyi áttéti daganatában. 23 invázióban szerepet játszó ECM molekula mRNS expressziós szintjét határoztuk meg és közülük 5 molekula esetében immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatot is végeztünk. A harmadik fázisban elvégzett mérésekhez 30 szövetmintát elemeztünk: 11 glioblasztómát, 10 tüdő eredetű adenokarcinóma szoliter agyi áttétét és 9 peritumorális agyszövetmintát válogattunk össze, melyeknél 30 inváziós molekula mRNS expresszióját mértük meg és 7 molekula (IHC) analízisét végeztük el. A negyedik méréshez összesen 36 szövetmintát vizsgáltunk: 9 II-es grádusú asztrocitóma, 10 tüdő adenokarcinóma agyi metasztázis, 8 schwannoma és 9 tumormentes peritumorális agyszövetmintát dolgoztunk fel. Ebben a fázisban az inváziós panel 26 molekulából állt és 4 molekulán végeztünk IHC vizsgálatot.

Az RNS analízisre szánt mintákból előbb metszeteket készítettünk szövettani diagnózishoz és immunhisztokémiai vizsgálatokra, majd a maradék szövetdarabot RNS izolálásra továbbítottuk. A szövettani diagnózist a klinikumtól független sorsú kódolt mintákon gyakorlott neuropatológus állapította meg.

	Fehérjék	Gének	TLDA azonosító
1	Beta-actin	ACTB	Hs99999903_m1
2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs99999905_m1
3	Beta-2-microglobulin	B2M	Hs00187842_m1
4	CD44	CD44	Hs00153304_m1
5	CD168 (RHAMM)	HMMR	Hs00234864_m1
6	Aggerekán	AGC1	Hs00153936_m1
7	Verzikán	CSPG2	Hs00171642_m1
8	Brevikán	BCAN	Hs00222607_m1
9	Neurokán	CSPG3	Hs00189270_m1
10	Neuroglükán C	CSPG5	Hs00198108_m1
11	HAS1	HAS1	Hs00758053_m1
12	HAS2	HAS2	Hs00193435_m1
13	HAS3	HAS3	Hs00193436_m1
14	Kondroitinases (AC és ABC)	GALNS	Hs00166833_m1
15	Szindekán1	SDC1	Hs00174579_m1
16	Szindekán2 (HSPG1)	SDC2	Hs00299807_m1
17	Szindekán3 (N-Szindekán)	SDC3	Hs00206320_m1
18	Szindekán4 (Amphiglycan, Ryudocan)	SDC4	Hs00161617_m1
19	Laminin alpha1	LAMA1	Hs00300550_m1
20	Laminin alpha2	LAMA2	Hs00166308_m1
21	Laminin alpha4	LAMA4	Hs00158588_m1
22	Laminin beta1	LAMB1	Hs00158620_m1
23	Laminin beta2	LAMB2	Hs00158642_m1
24	Laminin gamma1	LAMC1	Hs00267056_m1
25	Tenaszcín-C (Hexabrachion)	TNC	Hs00233648_m1
26	Tenaszcín-R (Restrictin, Janusin)	TNR	Hs00162855_m1
27	Fibronektin	FN1	Hs00277509_m1
28	(Matrilin1)	MATN1	Hs00159075_m1
29	Matrilin2	MATN2	Hs00242753_m1
30	Fibrillin1	FBN1	Hs00171191_m1
31	Fibrillin2	FBN2	Hs00417208_m1
32	Fibrillin3	FBN3_HUMAN	Hs00261049_m1
33	Elasztin	ELN	Hs00355783_m1
34	Aggrin	AGRN	Hs00394748_m1
35	Perlekán (HSPG2)	HSPG2	Hs00194179_m1
36	Kollagén - Type I alpha1	COL1A1	Hs00164004_m1
37	Kollagén - Type III alpha1	COL3A1	Hs00164103_m1
38	Kollagén - Type IV alpha1	COL4A1	Hs00266237_m1
39	Kollagén - Type VIII alpha1	COL8A1	Hs00156669_m1
40	Kollagén - Type VIII alpha2	COL8A2	Hs00697025_m1
41	Aquaporin1	AQP1	Hs00166067_m1
42	Aquaporin2	AQP2	Hs00166640_m1
43	Aquaporin3	AQP3	Hs00185020_m1
44	Aquaporin4	AQP4	Hs00242342_m1
45	FGF8	FGF8	Hs00171832_m1
46	WNT1	WNT1	Hs00180529_m1
47	WNT2	WNT2	Hs00608224_m1
48	WNT2B	WNT2B	Hs00244632_m1
49	Lactadherin (MFG-E8, HMFG)	MFGE8	Hs00170712_m1
50	Kadherin E	CDH1	Hs00393592_m1
51	Kadherin N	CDH2	Hs00169953_m1

52	Kadherin N2 - Brain Kadherin	CDH12	Hs00415843_m1
53	Kadherin P	CDH3	Hs00354998_m1
54	TGF Beta1 (Camurati-Engelmann disease)	TGFB1	Hs99999918_m1
55	TGF Beta2	TGFB2	Hs00234244_m1
56	TGF Beta3	TGFB3	Hs00234245_m1
57	TGF Beta-induced, 68kDa	TGFBI	Hs00165908_m1
58	TGF Beta-induced factor (TALE family homeobox)	TGIF	Hs00820148_g1
59	TGF Beta-induced factor2 (TALE family homeobox)	TGIF2	Hs00222358_m1
60	TGF Beta-induced factor2-like, X-linked	TGIF2LX	Hs00536782_s1
61	TGF Beta-induced factor2-like, Y-linked	TGIF2LY	Hs00536782_s1
62	Transglutaminase1 (K polypeptide epidermal type I)	TGM1	Hs00165929_m1
63	Transglutaminase2 (C polypeptide)	TGM2	Hs00190278_m1
64	Transglutaminase3 (E polypeptide)	TGM3	Hs00162752_m1
65	Transglutaminase5	TGM5	Hs00188562_m1
66	Transglutaminase7	TGM7	Hs00369497_m1
67	Factor XIII A1	F13A1	Hs00173388_m1
68	Factor XIII B	F13B	Hs00157471_m1
69	Integrin - Alpha1	ITGA1 - PELO	Hs00235030_m1
70	Alpha2 (CD49B)	ITGA2	Hs00158148_m1
71	Alpha2B (CD41B)	ITGA2B	Hs00385235_m1
72	Alpha3 (CD49C)	ITGA3	Hs00233722_m1
73	Alpha5 (Fibronectin receptor)	ITGA5	Hs00233732_m1
74	Alpha6	ITGA6	Hs00173952_m1
75	Alpha7	ITGA7	Hs00174397_m1
76	Alpha8	ITGA8	Hs00233321_m1
77	Alpha9	ITGA9	Hs00174408_m1
78	Alpha10	ITGA10	Hs00174623_m1
79	Alpha11	ITGA11	Hs00201927_m1
80	Beta1 (Fibronectin receptor, CD29)	ITGB1	Hs00559595_m1
81	Beta2 (CD18)	ITGB2	Hs00164957_m1
82	Beta3 (CD61)	ITGB3	Hs00173978_m1
83	Beta4	ITGB4	Hs00236216_m1
84	Beta5	ITGB5	Hs00609896_m1
85	MMP-1 (Interstitial Kollagenase)	MMP1	Hs00233958_m1
86	MMP-2 (Gelatinase A)	MMP2	Hs00234422_m1
87	MMP-8 (Neutrophil Kollagenase)	MMP8	Hs00233972_m1
88	MMP-9 (Gelatinase B)	MMP9	Hs00234579_m1
89	MMP-13 (Kollagenase 3)	MMP13	Hs00233992_m1
90	EGFR (erb B1)	EGFR	Hs00193306_m1
91	erb B2	ERBB2	Hs00170433_m1
92	erb B3	ERBB3	Hs00176538_m1
93	erb B4	ERBB4	Hs00171783_m1
94	Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Hs00157674_m1
95	CEA = CEACAM5	PSG2/CEACAM5	Hs00237075_m1
96	Citokeratin-18	KRT18	Hs01920599_gH
97	Citokeratin-19	KRT19	Hs00761767_s1
98	Ki-67	MKI67	Hs00606991_m1

3. táblázat. Az előzetes mRNS expressziós szintek meghatározásához az irodalmi eredmények alapján összeállított molekula- és génlista

mRNS analízis

A kiválasztott molekulacsoport mRNS expresszióját egyedi rendelés alapján előállított ún. „DNS-kártya” segítségével végeztük el („Micro Fluidic Card” - Applied Biosystems, USA). Az inváziós panelt alkotó sejtfelszíni receptorokat és ligandjaikat vizsgáltuk. A tumor eredetét igazoló markereket (*glial fibrillary acidic protein* [GFAP] és citokeratin 18,19), a Ki-67 proliferációs markert és belső standardként a beta-aktin és gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz [GAPDH] expresszióját szintén vizsgáltuk.

A frissen (folyékony nitrogénben) fagyasztott mintákat manuális CryoPress eszközzel (Microtec Co., Ltd, Japan) porlasztottuk. A frissen porlasztott mintákat ezután a megfelelő mennyiségű TriReagent (Invitrogen, USA) oldatba helyeztük, és azonnal rotor-stator homogenizátorral homogenizáltuk. Total RNS-t a TriReagent lizátumból a gyártó előírásai alapján vontuk ki. Az RNS tisztaságát és mennyiségét NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) segítségével határoztuk meg majd -80°C -on tároltuk. RNS minőségét 1,2%-os agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk ethidium bromide festék segítségével. Total RNS-t egyláncú cDNS-be konvertáltuk High Capacity cDNA Archive Kit with RNasin (Applied Biosystems, USA) segítségével (600 ng total RNS mintánként egy reverz transzkriptáz reakcióban). Az átírt cDNS-t egy „microfluidic card” portjaiba helyeztük.

TaqMan Low Density Array (TLDA) kísérleteket végeztünk Applied Biosystems 7900HT real-time PCR rendszer segítségével Micro Fluidic Card upgrade-ben (Applied Biosystems, USA). A Micro Fluidic Card format a mintánkénti 40 gén analízisét teszi lehetővé. Minden mintáról másolat is készült, amit szintén analizáltunk. A Micro Fluidic Card-dal nyert eredményeket SDS 2.1 software segítségével elemeztük ki automatikus küszöbérték mellett és a már meghatározott C_T értéket használva határoztuk meg a mintákban jelenlévő cDNS mennyiségét. Minden esetben meghatároztuk a “housekeeping” GAPDH gén expressziós mértékét is. A GAPDH mutatta a legkisebb variációt az egyes minták között és referencia génként szolgált a dC_t értékek kiszámításánál.

Expressziós értékeket a comparative C_T method segítségével határoztuk meg, ahogy azt az irodalomban már korábban leírták (Livak és Schmittgen, 2001). Röviden, feltételezve, hogy a PCR hatékonysága bármely gén esetében TLD-Assay-t használva az 1-hez közelít, egy tumoros vagy normál (kalibrátor) mintában a gén mRNS expresszióját (Han és mtsai. 2005) össze lehet hasonlítani a következő egyenlet segítségével (Hirose és mtsai. 2001):

$$X_{\text{tumor}} = 2^{-dC_{T\text{tumor}}} \text{ és } X_{\text{normal}} = 2^{-dC_{T\text{normal}}}$$

$2^{-\Delta CT}$ értékét GeneSpring 7.3 software (Silicon Genetics, Redwood City CA, USA) segítségével határoztuk meg; így megkaptuk az egyedi, individuális mRNS expressziós (X) különbségeket a mintákon belüli kategóriákban.

Immunhisztokémia (IHC) és mikroszkópos analízis

Az első fázisban IHC vizsgálatokat nem végeztünk.

A második fázisban 5 molekula IHC festődési intenzitását vizsgáltuk: neurokán, szindekán, verzikán, MMP-2 és MMP-9.

A harmadik fázisban történt méréseknél a mRNS meghatározás eredményeinek értékelése után hét molekulát választottunk ki és vizsgáltunk fehérjeszinten immunhisztokémiailag: az agrint, a neurokánt, a szindekánt, a vezikánt, a MMP-2-t és 9-et, valamint a hialuronant.

A negyedik fázisban a mRNS eredmények értékelése után a brevikán, neurokán, tenaszcin-C és a verzikán került kiválasztásra proteinszintű immunhisztokémiai vizsgálatra.

A fagyasztott mintákat Saint Marie oldatban (Sainte-Marie, 1962; Tuckett és Morriss-Kay, 1988) fixáltuk 24 órán keresztül 4°C-on. A fixáció és dehidráció után a mintákat viaszba ágyaztuk és 5- μ m vastag szeleteket készítettünk. A mintákat haematoxylin-eosin festékekkel festettük meg, de emellett immunhisztokémiai eljárást is alkalmaztunk a következő protokoll szerint: a mintákat előinkubáltuk ready-to-use 2.5% normal horse szérumban (Vector, Burlingame, CA, USA) 30 percen keresztül 37°C-on, így a nem specifikus primer antitest kötődését gátoltuk meg. Brevikán meghatározásához MAB40091 (Monoclonalis Antibody Brevikán40091) (R&D Systems, Minneapolis, USA), neurokánhoz AB26003 (ABCAM, Cambridge, USA), tenaszcinhoz AB19011 és a verzikánhoz AB1032 (Chemicon, Millipore, USA) antitesteket használtunk.

A metszeteket ezután 4 °C-on inkubáltuk 12 órán keresztül a megfelelően hígított antitesteket tartalmazó oldatban. A morfológiai vizsgálatokhoz immunhisztokémiai és hemalaun festést végeztünk.

Az immunhisztokémiai metszeteket három különböző, tapasztalt kutató elemezte ki és értékelte a 2. fázisban 1-től 4-ig, a 3. fázisban a különbségek észlelésének finomítása érdekében 1-től 5-ig terjedő skálán. A pontértékek az intercelluláris stroma festődési intenzitását jellemezték, ahol az 1-es érték a negatív, a maximális érték a legintenzívebben festődő mintát jelentette.

Statisztikai módszerek

A mérések pontosítása és a statisztikai analízis érdekében minden quantitative real time polymerase chain reaction (QRT-PCR) mérést kétszer végeztünk el. Mintáink statisztikai elemzése során az egyes gének expressziós szintjei közötti különbség meghatározásához a Mann-Whitney féle U-próbát alkalmaztuk. A $p \leq 0,05$ esetén az eredményeket szignifikánsnak tekintettük.

3.7. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára

Betegek

Ehhez a tanulmányhoz 31, idegsebészeti műtét során eltávolított és intraoperatív gyorsfagyasztott humán GBM szövetmintát vizsgáltunk. A mintákat a Debreceni Idegsebészeti Agydaganat és Szövetbankból válogattuk ki úgy, hogy 15 minta onkoterápiában még nem részesült betegtől származott, 16 esetben pedig sugár- és kemoterápiát követően kiújult daganat reszekciója során nyert tumorszövetet dolgoztunk fel. A betegek onkoterápiájának összefoglalását az 4. táblázat tartalmazza. A műtét során eltávolított mintát azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és feldolgozásig -80°C -on tároltuk. A szövettani diagnózist tapasztalt neuropatológus verifikálta. A szövetmintákban az inváziós panel részeként 19 darab ECM alkotóelem RNS és fehérje szintű génexpresszióját határoztuk meg. A mátrix molekulákat, melyek között transzmembrán fehérje, bontó enzim és PG is van, a korábbi kutatási eredményeink alapján választottuk ki [6,7] (5. táblázat).

Betegszám	Kezelés
Beteg 1	RT + 2 TEM
Beteg 2	CRT + 6 TEM
Beteg 3	CRT
Beteg 4	RT + 4 TEM
Beteg 5	CRT + 6 TEM
Beteg 6	CRT + 6 TEM
Beteg 7	CRT + 6 TEM
Beteg 8	CRT

Betegszám	Kezelés
Beteg 9	CRT + 2 TEM
Beteg 10	CRT + 6 TEM
Beteg 11	CRT
Beteg 12	CRT + 2 TEM
Beteg 13	RT + 15 TEM
Beteg 14	CRT
Beteg 15	RT + 15 TEM
Beteg 16	CRT + 1 TEM

4. táblázat. A kezelés utáni betegcsoport onkoterápiájának részletei. RT: 30x1,8Gy fokális agyi sugárkezelés, CRT: konkuráló kemioirradiáció (RT+7 5mg/m² temozolomid napi adása), TEM: temozolomid monoterápia (első ciklus: 150 mg/m², utána 200 mg/m²)

Gén	TLDA azonosító
Brevikán	BCAN-Hs00222607_m1
Kadherin-N2	CDH12-Hs00415843_m1
CD168	HMMR-Hs00234864_m1
Kollagén type III alpha1	COL3A1-Hs00164103_m1
Erb B2	ERBB2-Hs00170433_m1
Fibronectin	FN1-Hs00277509_m1
Integrin alpha1	ITGA1-Hs00235030_m1
Integrin alpha3	ITGA3-Hs00233722_m1
Integrin alpha7	ITGA7-Hs00174397_m1
Integrin beta1	ITGB1-Hs00559595_m1
Laminin alpha4	LAMA4-Hs00158588_m1
Laminin beta1	LAMB1-Hs00158620_m1
Matrix metalloproteinase-2	MMP2-Hs00234422_m1
Matrix metalloproteinase-9	MMP9-Hs00234579_m1
Neurokán	NCAN-Hs00189270_m1
Szindekán-1	SDC1-Hs00174579_m1
Tenaszcín-C	TNC-Hs00233648_m1
Tenaszcín-R	TNR-Hs00162855_m1
Verzikán	VCAN-Hs00171642_m1

5. táblázat. A vizsgált gének (inváziós panel) és az RNS analízis során használt assay próbák listája

A vizsgált molekulák mintákban való mRNS szintjét valós idejű kvantitatív reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció (RT-QPCR) segítségével mértük meg, a kapott értékeket pedig komparatív C_T módszerrel számoltuk ki a korábban bevált módszer szerint [88, 89].

Az mRNS szint meghatározását követően kvantitatív fehérje analízist végeztünk. Először szövet homogenizátumot készítettünk, ugyanúgy, mint a QRT-PCR-hoz, azonban a szöveti lízishez 50 mM Tris, 1mM EDTA, 17 mM beta-mercaptoethanol és 0.5% Triton-X100 lízis puffert használtuk. A homogenizátum fehérje koncentrációját Bradford-módszerrel mértük meg [90]. A fehérjék relatív mennyiségének meghatározásárát az SRM (*selected reaction monitoring*) célzott tömegspektrometriás módszerével végeztük [91–95]. A kapott SRM spektrum görbe alatti területének kiszámításával, és további szoftveres analízissel (Analyst 1.4.2) megkaptuk az egyes minták fehérje szintjeit.

Statisztikai módszerek

Fehérje és mRNS szinten is a szignifikáns expressziókülönbséget Mann-Whitney U-teszttel határoztuk meg. A szignifikancia szint $p < 0,05$ volt, emellett 95%-os konfidencia intervallumot is számoltunk.

3.8. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban

Betegek

Összesen 27, idegsebészeti műtét során eltávolított humán agyszövetminta került feldolgozásra. Az alábbi három szöveti típust különböztettük meg: GBM makroszkóposan közvetlenül daganat melletti területe (peri-GBM, 9 db), tüdő adenokarcinóma intracerebrális metasztázis peritumorális zónája (peri-Met, 9 db) és nem tumoros agyszövet (Norm, 9 db). A peritumorális mintavételek csak akkor történtek meg, amikor az a tumor eltávolítása során elkerülhetetlen volt. A nem tumoros agyszövetmintákat epilepszia sebészet során eltávolított agyrészletekből gyűjtöttük. Mindegyik mintát a további vizsgálatok megkezdése előtt tapasztalt neuropatológus értékelte és osztályozta.

Gén	TLDA azonosító
Brevikán	BCAN-Hs00222607_m1
Kadherin-N2	CDH12-Hs00415843_m1
Kollagén type III alpha1	COL3A1-Hs00164103_m1
EGFR (erb B1)	EGFR-Hs00193306_m1
Erb B2	ERBB2-Hs00170433_m1
Fibronectin	FN1-Hs00277509_m1
CD168	HMMR-Hs00234864_m1
Integrin alpha1	ITGA1-Hs00235030_m1
Integrin alpha3	ITGA3-Hs00233722_m1
Integrin alpha7	ITGA7-Hs00174397_m1
Integrin beta1	ITGB1-Hs00559595_m1
Laminin alpha4	LAMA4-Hs00158588_m1
Laminin beta1	LAMB1-Hs00158620_m1
Matrix metalloproteinase-2	MMP2-Hs00234422_m1
Matrix metalloproteinase-9	MMP9-Hs00234579_m1
Neurokán	NCAN-Hs00189270_m1
Tenaszcin-C	TNC-Hs00233648_m1
Tenaszcin-R	TNR-Hs00162855_m1
Verzikán	VCAN-Hs00171642_m1

6. táblázat. A vizsgált gének (inváziós panel) és RNS analízis során használt assay próbáik listája

Az inváziós panel molekulái mRNS és fehérje expressziójának meghatározása

A molekulákat korábbi kutatási eredményeink alapján választottuk ki (6. táblázat) és a korábban részletezett módon végeztük el az RNS és fehérje expressziós értékek meghatározását [89, 92, 94, 95].

Statisztikai módszerek

A három szövettani csoport között fennálló feltételezett különbség igazolására ANOVA tesztet használtunk ahol ennek a feltételei teljesültek, más esetben pedig Kruskal-Wallis tesztet. Két csoport összehasonlítása során Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk, így tudtunk gén és fehérje szinten szignifikánsan különböző expressziós szintet azonosítani. Szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg és a szignifikáns eltéréseknél 95%-os konfidencia intervallumot (CI) is számoltunk.

3.9. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblasztómában

Kutatásunk során az Agydaganat- és Szövetbankból származó, intraoperatív gyorsfagyasztott GBM minták esetében végeztünk méréseket. Az mRNS és protein expressziót 20 ECM alkotó esetében vizsgáltuk (inváziós panel), melyeket a korábbi eredményeink alapján választottunk ki. Az inváziós panelbe ezúttal beválogatott molekulákat a 7. táblázat tartalmazza.

1	brevikán
2	kadherin-12
3	kollagén, type III, alpha-1 chain
4	EGFR
5	ERBB2
6	fibronektin-1
7	HMMR (CD168, RHAMM)
8	integrin, alpha-1 chain
9	integrin, alpha-3 chain
10	integrin, alpha-7 chain

11	integrin, beta-1 chain
12	laminin, alpha-4 chain
13	laminin, beta-1 chain
14	MMP-2
15	MMP-9
16	neurokán
17	szindekán-1
18	tenaszcin-C
19	tenaszcin-R
20	verzikán

7. táblázat. A kutatás során vizsgált inváziós panelt képviselő ECM alkotók. A molekulák mRNS és protein szintű expresszióját QRT-PCR és tömegspektroszkóp segítségével vizsgáltuk

Betegek és szövetminták

Vizsgálatainkhoz 26 betegből származó GBM mintát választottunk ki. A betegek átlagos életkora: $58,69 \pm 8,01$ min. 43 év max: 75 év volt. A mintabeválasztásnál alapvető szempont volt, hogy minden beteg azonos kezelési protokoll szerint került ellátásra: a betegek subtotalis daganatreszekció után konkuráló kemo-irradiációban és TMZ monoterápiában részesültek. TMZ mellett bekövetkező progresszió esetén bevacizumab monoterápiát alkalmaztunk ameddig a klinikai állapot lehetővé tette. A mintákat két csoportba osztottuk a teljes túlélés alapján; saját intézeti tapasztalataink alapján a Stupp protokollban részesülő betegek esetében meghatározott átlagos, 23 hónapos túlélést tekintettük szelekciós tényezőnek.

A 23 hónap vagy annál rövidebb teljes túléléssel rendelkező betegekből származó mintákból képeztük az „A” csoportot, míg a „B” csoportba a 23 hónapnál nagyobb teljes túlélést mutató betegek kerültek (A csoport 12 fő, B csoport 14 fő).

Módszer

A mintákban a kiválasztott molekulák mRNS szintű expresszióját kvantitatív real-time PCR-al, a fehérjeszintű expressziót tömegspektrométerrel határoztuk meg a korábbi vizsgálatainkkal megegyezően.

Statisztikai elemzés

A túlélési, valamint a molekulák expressziójának méréséből származó adatok összehasonlítását kétmintás t-próbával, illetve statisztikai aránybecsléssel végeztük. Az egyes molekulák túlélésre gyakorolt hatásának elemzése során az LWL (*locally weighted learning*) és „J48 pruned tree” döntési fa elnevezésű statisztikai osztályozókat használtuk. A statisztikai elemzést biomatematikus segítségével a Weka 3.6 statisztikai elemzőszoftverrel végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A jelenlegi onkoterápia effektivitásának meghatározása glioblasztóma esetében saját beteganyagon

A DE KK Idegsebészeti Klinikán 2002 és 2012 között a vizsgálati feltételeknek megfelelő 104 glioblasztómás beteg terápiafüggő túlélési adatainak elemzéséhez felhasznált klinikai paramétereket a 8. táblázat tartalmazza.

Megfigyeléseink szerint az átlagéletkorokban (BSC: $66,1 \pm 10,3$; pRT: $65,6 \pm 18,9$; RT: $63,7 \pm 8,5$; RT+TMZ: $51,8 \pm 13,5$; RT+TMZ+ BC: $55,2 \pm 9,6$) szignifikáns eltérés nem volt. Az egyes csoportokban megvizsgáltuk a betegek nemi összetételét is, mely egyedül a pRT csoportban mutatta a férfiak többségét, egyébként a többi csoport között jelentős különbség nem igazolódott. A tumor oldaliságának tekintetében a csoportok nem különböznek egymástól szignifikánsan.

Kutatásunkban a RT+TMZ csoportba tartozó betegek esetében a preoperatív és posztoperatív Karnofsky érték 77,7 illetve 80,3 volt. Ehhez nagyon hasonló a változás az RT+TMZ+ BC csoportban: a preoperatív KPS 76,0-ról műtét után 81,0-ra emelkedett. A RT csoportban a Karnofsky értékek 72,0 illetve 74,0. Itt is javulás volt megfigyelhető, habár a kiindulási érték is alacsonyabb volt az előző csoporthoz viszonyítva. A csak pRT-ban részesült betegeknél a Karnofsky érték nem változott, mind operáció előtt, mind utána 60,0 pontnak adódott, míg a BSC csoport esetében a preoperatív 70,0 pont 56,0-ra csökkent a terápiás beavatkozást követően. A preoperatív KPS esetén a pRT csoport értékei különböztek a RT+TMZ illetve az RT+TMZ+BC csoport értékeitől, de más különbség nem volt igazolható. Ugyanakkor a BSC csoportban a posztoperatív KPS szignifikánsan kisebb volt a többi csoporthoz képest, a pRT csoportot leszámítva. A csak sugárterápiában részesülő betegek posztoperatív KPS értékei továbbá szignifikánsan különböztek a konkuráló kemo-irradiációs kezelésben részesülő betegek értékeitől.

	eset- szám	életkor (átlag, év)	méret (cm)	preop. KPS	postop. KPS	nem (%)	oldal (%)	PFS (átlag, hó)	OS (átlag, hó)
BSC	15	66,1	5,2	70,0	56,0	f:53	b:70	1,4	3,7
palliatív RT	9	65,6	5,1	60,0	60,0	f:78	b:56	1,1	4,2
RT	20	63,7	4,3	72,0	74,0	f:45	b:60	4,7	9,1
RT+TMZ	35	52,4	4,4	77,7	80,3	f:64	b:60	7,4	15,3
RT+TMZ+BC	25	55,2	44,3	76,0	81,0	f:52	b:56	11,8	22,9

8. táblázat. 104 glioblasztóma miatt operált beteg fontosabb klinikai paraméterei (BSC = *best supportive care*; RT = sugárterápia; RT+TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; RT+TMZ+BC = a kemo-radioterápia BC kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén; KPS = Karnofsky Performance Scale pontértéke; PFS = progresszió mentes túlélés; OS = teljes túlélés f = férfi; b = bal)

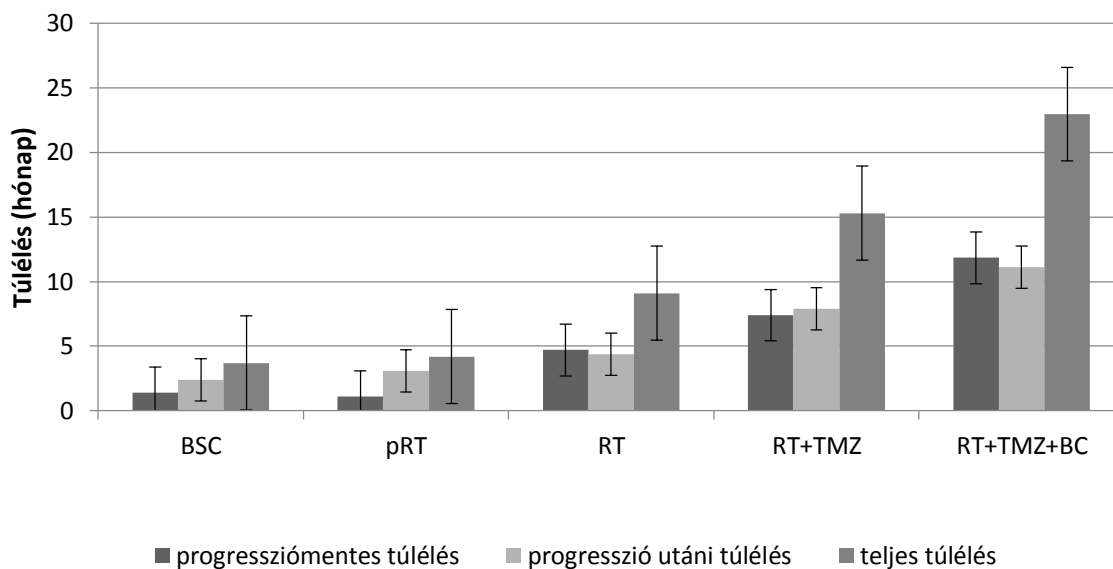
Progressziómentes és teljes túlélés

Terápiát követően megfigyeltük a betegek progressziómentes túlélését az egyes csoportokban. Progressziónak az MRI vizsgálat által igazolt 20 %-ot meghaladó volumen növekedést, vagy új tumor megjelenését tekintettük. A BSC-ben részesült betegcsoportban az átlagos PFS $1,4 \pm 1,4$ hónapnak bizonyult. A pRT-t kapott betegekben az előzővel szemben rosszabb eredményt kaptunk: $1,1 \pm 0,4$ hónap. A sugárkezelést kapott betegek körében $4,7 \pm 4,7$ hónapnak adódott a PFS, míg a kombinált RT+TMZ-ban részesült betegek esetében: $7,4 \pm 5,5$ hónap. A RT+TMZ+BC csoportban a konkuráló kezelés utáni TMZ monoterápia utáni radiológiai progresszióig eltelt idő $11,8 \pm 8,5$ hónap volt. Ugyanebben a csoportban a bevacizumab kezelés után megjelenő további progresszióig eltelt idő $8,5 \pm 5,4$ hónap volt (1. ábra).

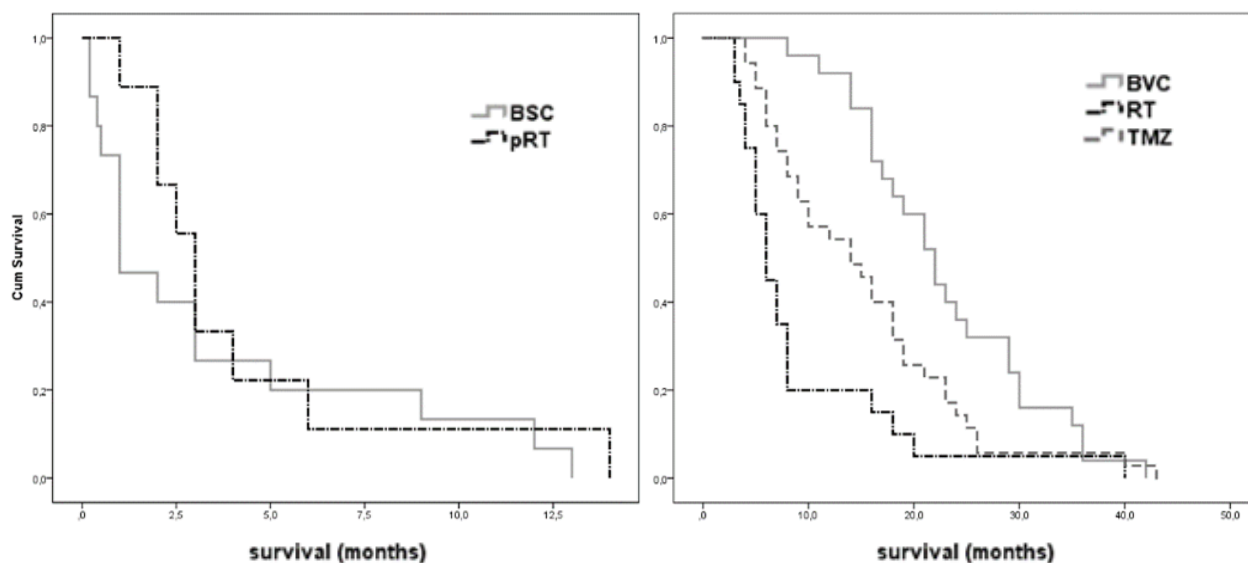
A terápia hatékonyságát hivatott jelölni a progresszió utáni átlagos teljes túlélési idő is. A mi esetünkben a következő eredményeket kaptuk: BSC-ben részesült betegek esetében a progresszió utáni átlagos túlélés $2,4 \pm 3,7$ hónap, pRT esetében $3,1 \pm 3,9$, RT esetében $4,4 \pm 5,8$, míg a túlélés a kombinált RT+TMZ esetében $7,9 \pm 7,6$ hónap, RT+TMZ+BC csoportban a TMZ kezelés utáni progresszió utáni átlagos túlélés: $11,1 \pm 5,8$ hónap, viszont a bevacizumab kezelést követő progresszió utáni túlélés $2,6 \pm 2,6$ hónapnak bizonyult.

Az adatokból kitűnik, hogy a TMZ kezelés szignifikánsan növelte a PFS-t az RT-hez képest, amit a bevacizumab kezelés tovább emelt ($P_{RT \text{ vs. } RT+TMZ} = 0,0098$ illetve $P_{RT+TMZ \text{ vs. } RT+TMZ+BC} = 0,0232$). Ezzel szemben az is megállapítható, hogy a pRT-nak a tumorprogresszió szempontjából számottevő effektivitása nem bizonyítható ($P_{BSC \text{ vs. } pRT} = 0,7186$). A diagnózist követő teljes átlagos túlélés a különböző csoportokban: BSC-ben részesült betegek esetében

3,7±4,3, pRT-t kapott betegeknél 4,2±4,0, RT-ban részesültekénél 9,1±8,7, míg RT+TMZ terápia esetén 15,3±9,5 hónap, ill. RT+TMZ+BC csoportban 23,0±8,6 hónap.



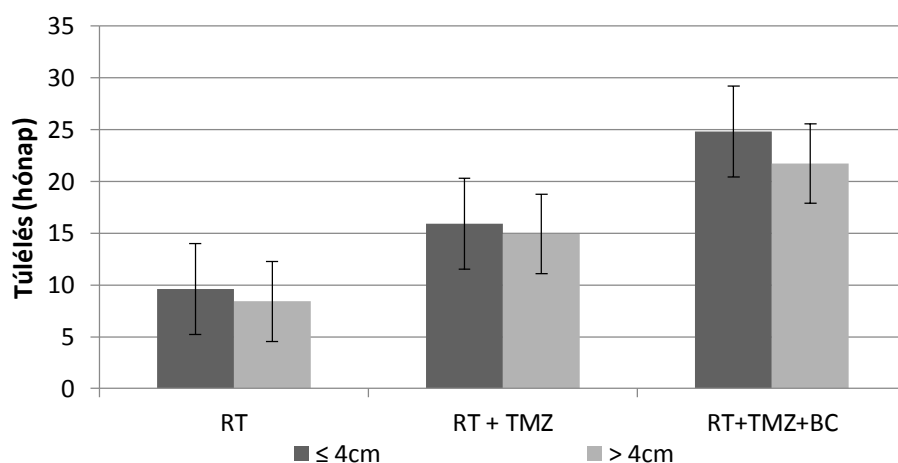
1a. ábra. Különböző módon kezelt glioblasztómás betegek túlélése (BSC = *best supportive care*; RT = sugárterápia; pRT = palliatív sugárterápia; RT+TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; RT+TMZ+BC = a kemo-radioterápia bevacizumab kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén)



1b. ábra. Különböző módon kezelt glioblasztómás betegek kumulatív túlélése Kaplan-Meier analízissel (BSC = *best supportive care*; RT = sugárterápia; pRT = palliatív sugárterápia; TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; BVC = a kemo-radioterápia bevacizumab kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén)

Tumorméret

Az átlagos túlélést vizsgálva a felfedezéskor mért tumorméret függvényében a következő eredményekre jutottunk. 4 cm alatti tumor esetében a RT-ban részesült betegek átlagos túlélése $9,6 \pm 10,6$ hónap, míg az ugyanilyen méretű, de kombinált, RT+TMZ-ban részesült betegek esetében $15,9 \pm 9,1$ hónap, a RT+TMZ+BC csoportban $24,8 \pm 7,6$ hónap. A 4 cm feletti tumorok esetében a számok a következőképpen alakulnak: csak RT-ban részesült betegeknél $8,4 \pm 5,6$ hónap, RT+TMZ kezelés esetén $14,9 \pm 9,7$ hónap, míg RT+TMZ+BC csoportban $21,7 \pm 9,3$ hónap. Az adatokból egyértelműen kitűnik, hogy sem a csak RT-t kapott betegek esetében, sem kemoterápiával kombinált kezelés esetében sem volt a tumorméret statisztikailag igazolható befolyással a túlélésre ($P_{RT} = 0,7824$, $P_{RT+TMZ} = 0,5593$, $P_{RT+TMZ+BC} = 0,3949$) (2. ábra).



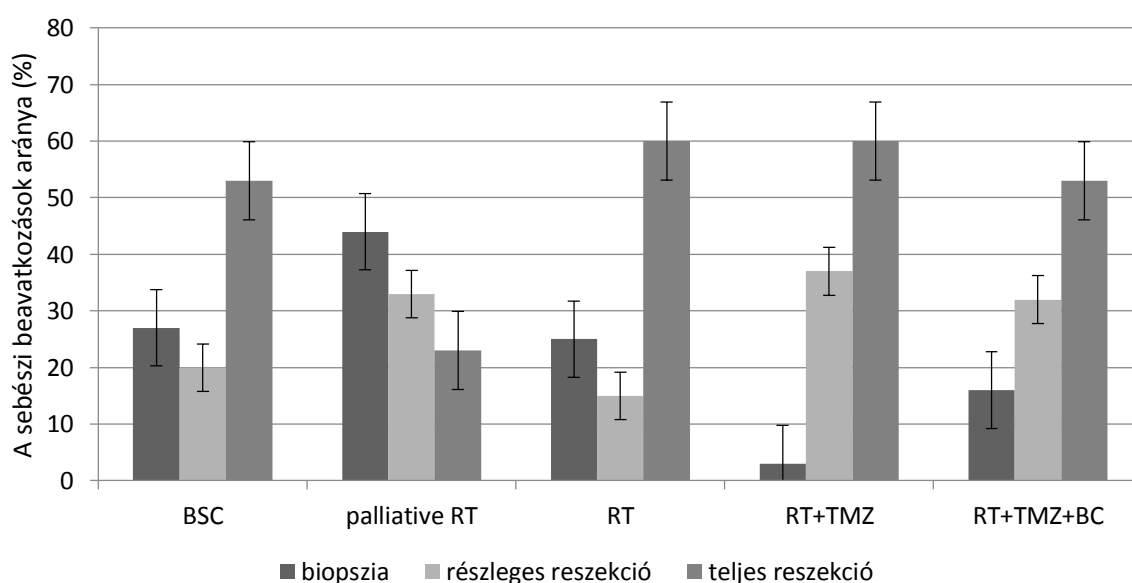
2. ábra. Túlélés a tumorméret és a kezelés függvényében glioblasztómás betegekben. (RT = sugárterápia; RT+TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; RT+TMZ+BC = a kemo-radioterápia bevacicumab kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén)

A tumorok átlagos átmérője a különböző csoportokban: 5,2 cm (BSC), 5,1 cm (pRT), $4,3 \pm 1,5$ cm (RT), $4,4 \pm 0,9$ cm (RT+TMZ) és $4,6 \pm 1,1$ cm (RT+TMZ+BC) csoportban. Ezek alapján látható, hogy a különböző posztoperatív kezelésben részesülő betegek tumormérete között szignifikáns eltérés nem igazolódott.

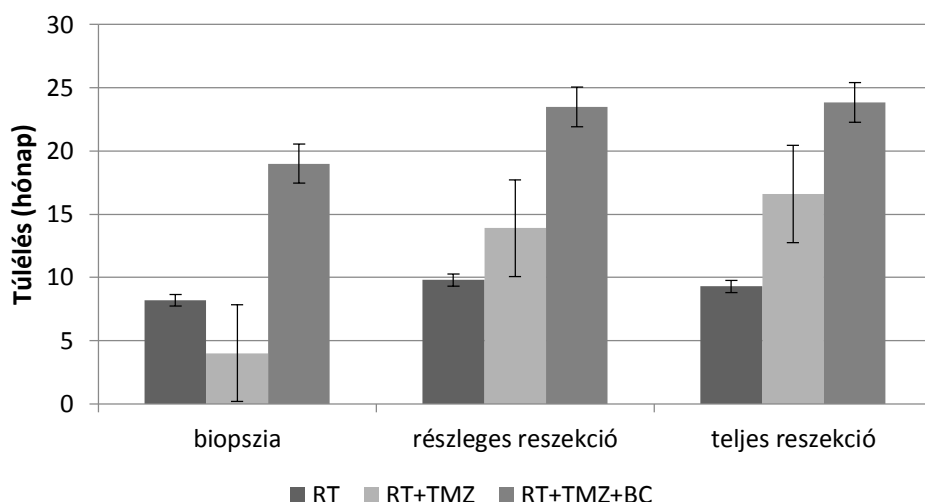
Műtéti típus

Megállapítható, hogy a biopszia aránya az RT+TMZ csoportban szignifikánsan kisebb volt, mint a BSC csoportban ($p=0,0394$), a pRT csoportban ($p=0,0042$) és a teljes dózisú RT csoportban ($p=0,0394$), ugyanakkor a különbség nem szignifikáns a bevacizumabbal kezelt csoporthoz képest ($p=0,18$). A RT, RT+TMZ, RT+TMZ+BC csoportokban a radikális és parciális tumorreszekciós műtétek aránya közel azonos volt ($P_{RT \text{ vs. RT+TMZ}} = 0,2668$, $P_{RT \text{ vs. RT+TMZ+BC}} = 0,2668$, $P_{RT+TMZ \text{ vs. RT+TMZ+BC}} = 0,7246$), (3. ábra).

A túlélést a műtéti típus szerint osztályozva azt az eredményt kaptuk, hogy a biopsziás műtét esetén, ahol csak RT történt, az átlagos túlélés $8,2 \pm 5,7$ hónap, míg kombinált kezelés esetében csak $4,0 \pm 0,8$ hónap (4. ábra). Parciális műtét és RT esetében a túlélés átlagosan $9,8 \pm 8,9$ hónap, míg kombinált kezelésnél $15,2 \pm 11,6$ hónap ($P_{RT \text{ vs. RT+TMZ}} = 0,4768$). Radikális eltávolítás esetében kaptuk a leghosszabb túlélési időt. Radikális eltávolítás esetében RT-val kombinálva az átlagos túlélési idő $9,3 \pm 10,3$ hónap, míg kombinált RT+TMZ csoportban az átlagos túlélés $18,3 \pm 15,6$ hónap ($P_{RT \text{ vs. RT+TMZ}} = 0,0841$). Az RT+TMZ+BC csoportnál a parciális műtéti típus teljes túlélése $23,5 \pm 11,1$, míg a radikális csoport esetében $23,8 \pm 5,9$ hónap volt ($P_{part. RT+TMZ+BC \text{ vs. rad. RT+TMZ+BC}} = 0,9262$).



3. ábra. A műtét típusának megoszlása a különböző posztoperatív kezelés szerint (BSC = *best supportive care*; RT = sugárterápia; pRT = palliatív sugárterápia; RT+TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; RT+TMZ+BC = a kemo-radioterápia bevacizumab kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén)



4. ábra. Túlélés a műtési típus és a kezelés függvényében glioblasztomás betegeknél. (RT = sugárterápia; RT+TMZ = sugárterápia konkuráló temozolomid kezeléssel kiegészítve; RT+TMZ+BC = a kemo-radioterápia bevaczimab kezeléssel történő kiegészítése progresszió esetén)

4.2. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagban: az 1 p19q kodeláció klinikai relevanciája oligodendrogliómákban

II-es grádusú, oligodendroglioma komponensű gliómákban 1,4-szer gyakrabban fordult elő 1p/19q-kodeláció, mint annak hiánya, míg a III-as grádusú gliómák között kétszer több 1p/19q-kodelációra nézve negatív esetet találtunk, mint pozitívat.

A daganat grádusa és 1p/19q-kodelációs státusza között nem tapasztaltunk szignifikáns korrelációt, de az alacsonyabb grádusú gliómákban számszerűen gyakrabban fordult elő a jobb prognózist jelentő 1p/19q-kodeláció, mint a magasabb grádusúakban.

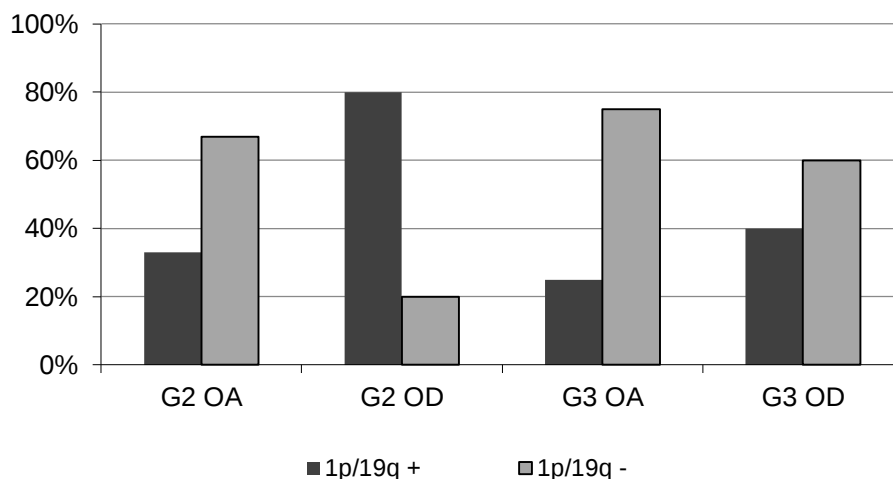
Az általunk vizsgált betegek esetében nem tapasztaltunk összefüggést a nem és az 1p/19q-kodeláció előfordulási gyakorisága között, amely 50%-osnak adódott mind a férfiak, mind a nők körében.

II-es grádusú tumorok esetében a betegek életkora és az 1p/19q-státusz között összefüggés nem igazolódott. III-as grádusú tumorokban az életkor előrehaladtával egyre ritkábban fordult elő 1p/19q-kodeláció. A kodelációval bíró betegek átlagéletkora szignifikánsan alacsonyabb az azzal nem rendelkezőkéhez képest (39 versus 56 év, $p = 0,043$).

A daganatok reszekálhatóságát a műtési típuson keresztül vizsgáltuk. II-es grádusú daganatok esetében az 1p/19q-kodeláció előfordulása egyértelmű összefüggést mutatott a daganatok reszekálhatóságával. A III-as grádusú tumorok esetében a kiterjedt, csak parciálisan reszekálható gliómák közül egyben sem volt kimutatható 1p/19q kodeláció.

A lebenyek szerinti tumorlokalizáció vonatkozásában az 1p/19q-kodelécióra nézve messzemenő összefüggés nem állapítható meg.

A II-es grádusú oligoasztrocitómákban kétszer ritkábban tapasztaltuk az 1p/19q-kodeléciót, mint annak jelenlétét a daganatsejtekben. II-es grádusú oligodendrogliómáknál négyszer gyakrabban fordult elő a kodeléció, mint annak hiánya. III-as grádusú oligoasztrocitómáknál szintén a kodeléció hiánya volt gyakoribb, míg oligodendrogliómáknál nem találtunk jelentős különbséget. Tehát az 1p/19-kodeléció gyakrabban fordul elő oligodendrogliómákban, mint oligoasztrocitómákban (5. ábra).



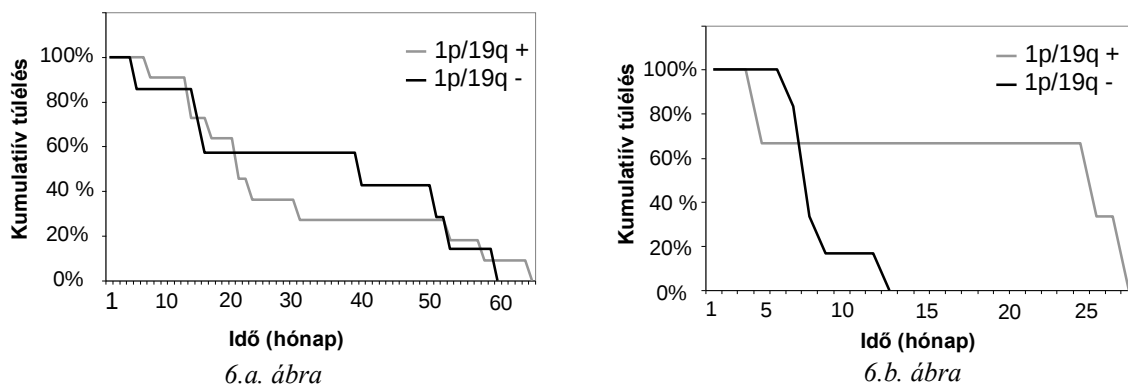
5. ábra. 1p/19q-kodeléció százalékos előfordulása a daganatok szövettani típusának és grádusának függvényében. 1p/19q+ = kodeléció igazolható, 1p/19q- = kodeléció nem igazolható, G = grade, OA = oligoasztrocitóma, OD = oligodendroglióma

A progressziómentes túlélés és az 1p/19q státusz kapcsolata a grádus, a szövettan, illetve az alkalmazott sebészi és posztoperatív onkoterápia függvényében

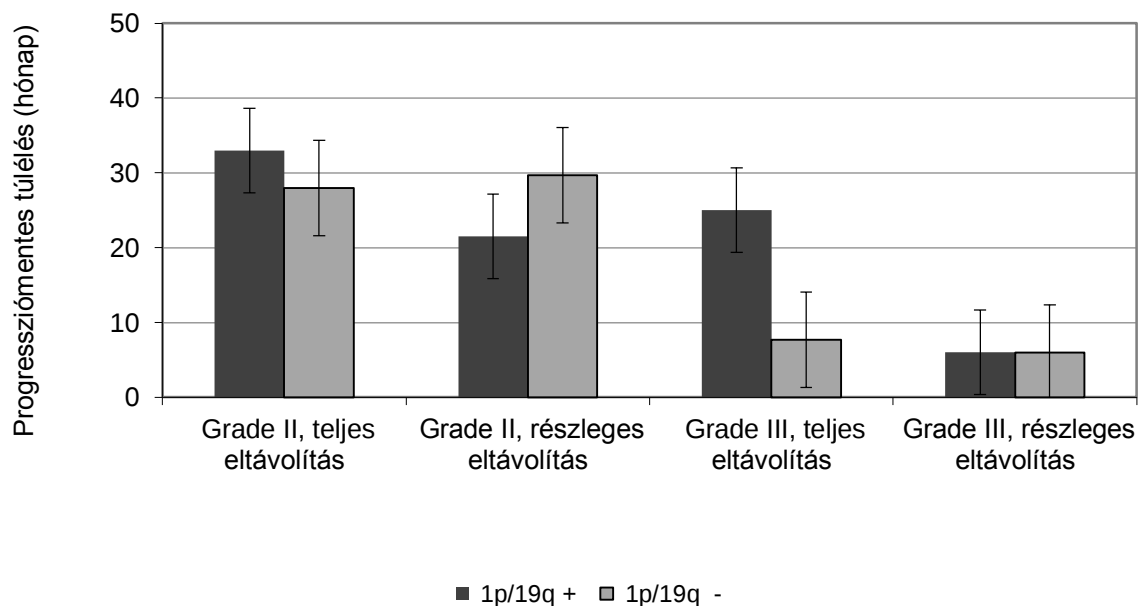
II-es grádusú daganatok esetében az 1p/19q-státusz és a PFS között összefüggés nem volt igazolható (6.a ábra). III-as grádus esetén az 1p/19q-kodeléciós betegek PFS-e jelentősen hosszabbnak bizonyult az azzal nem rendelkezőkéhez képest (25,0 versus 6,8 hónap, $p = 0,009$; 6.b ábra), azaz az 1p/19q-kodeléció előfordulása a PFS-sel III-as grádusú gliómák esetében pozitív összefüggést mutatott.

II-es grádus esetén a műtét radikalitása statisztikailag nem befolyásolta jelentősen a recidívamentes túlélést, a totális reszekcióval kezelt III-as grádusú tumorok esetében azonban

1p/19q-kodeláció esetében a recidívamentes túlélés szignifikánsan hosszabb volt a kodelációval nem rendelkező esetekéhez képest (25 versus 7,6 hónap, $p = 0,0028$) (7. ábra).



6. ábra. Progressziómentes túlélés Gr.II-es (6.a.) és Gr.III-as (6.b.) oligoasztrocitómák és oligodendrogliómák esetén. 1p/19q+ = kodeláció igazolható; 1p/19q- = kodeláció nem igazolható. 6.a. ábra: II-es grádusú daganatok esetében, 6.b. ábra: III-as grádusú daganatok esetében



7. ábra. Különböző 1p/19q-kodelációs státuszú oligoasztrocitómás és oligodendrogliómás betegek progressziómentes túlélése a műtét típusa és a grádus függvényében. 1p/19q+ : kodeláció igazolható; 1p/19q- : kodeláció nem igazolható

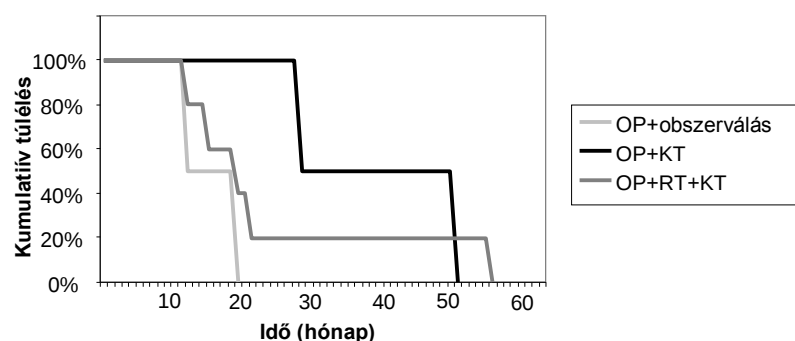
Terápia

Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy az 1p/19q-kodelíció jelenléte a daganatban befolyásolja-e - és ha igen, hogyan – a sebészi, illetve komplex daganatellenes terápiában részesült betegek PFS-ét? A kezelés szempontjából a betegeket a következő csoportokba lehetett osztani (mind II-es, mind III-as grádusú daganatok esetén): műtét; műtét és sugárterápia; műtét és kemoterápia; műtét és komplex kezelés (sugárterápia + kemoterápia). A terápiára vonatkozó konzekvenciákat túlélési görbék alapján vontuk le.

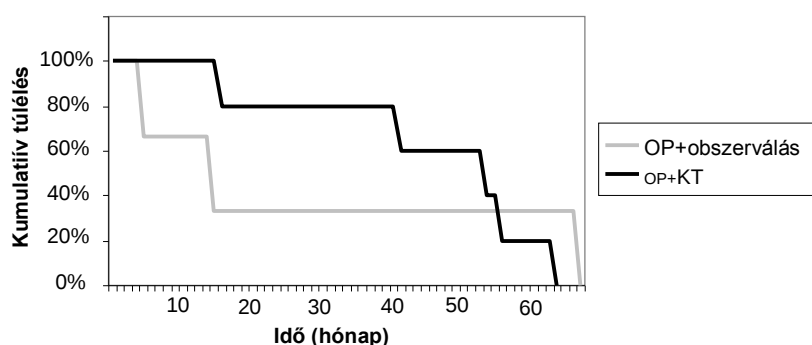
A II-es grádusú, pozitív 1p/19q-kodelíciós státuszú oligoasztrocitómás, illetve oligodendrogliómás betegek közül azon betegcsoport túlélése, amelynek tagjai nem kaptak további kezelést a műtét után, lényegesen rövidebb volt a másik két csoportéhoz képest, tehát a posztoperatív onkoterápia jelentősen meghosszabbította a PFS-t. A csak kemoterápiával kezelték PFS-e nem tért el számottevően a komplex módon kezeltékétől (8. ábra).

A II-es grádusú, negatív 1p/19q-kodelíciós státuszú oligoasztrocitómás, illetve oligodendrogliómás betegek 37,5 %-a nem részesült a műtét után további kezelésben, 62,5 %-a viszont posztoperatív kemoterápiát kapott. A két csoport PFS-ének maximumában nem volt jelentős különbség, de a posztoperatív kezelésben nem részesülő betegek túlélési görbéjének meredeksége nagyobb (túlélési átlaga kisebb) volt (9. ábra).

A III-as grádusú tumorok esetében jóllehet a kombinált kezelés előnyei egyértelműen megmutatkoztak, az alacsony esetszámok miatt definitív összefüggések nem voltak megállapíthatók.



8. ábra. Recidívmentes túlélés II-es grádusú, 1p/19q kodelíció pozitív oligoasztrocitómák és oligodendrogliómák esetén a terápia függvényében. OP = műtét; KT = kemoterápia; RT= radioterápia

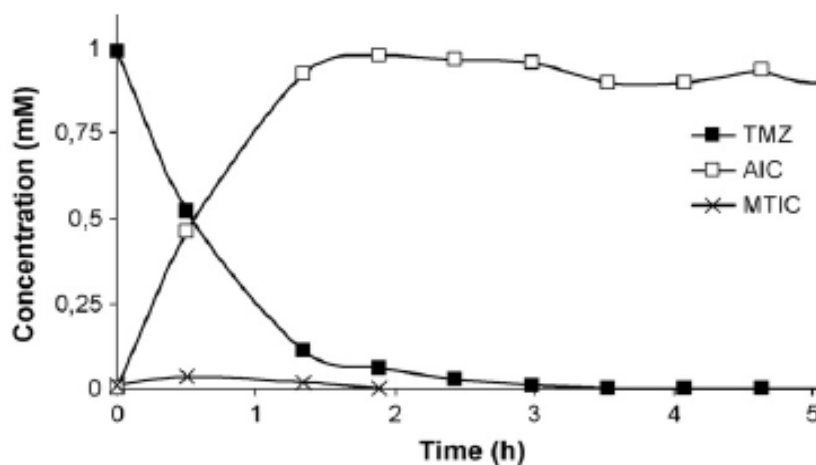


9. ábra. Recidívmentes túlélés II-es grádusú, 1p/19q kodeláció negatív oligoasztrocitómák és oligodendrogliómák esetén a terápia függvényében. OP = műtét; KT = kemoterápia

4.3. A temozolomid vizsgálata glioblasztómában

4.3.1. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztómás betegekben

A TMZ koncentrációjára vonatkozó érték egy adott minta esetében csak a CE készülékbe történő injektálás idejére tekinthető érvényesnek és csak ritkán biztosít releváns információt a mintavételi lépéskor fennálló valós koncentrációról (pl. amikor a vérmintát leveszik a betegtől). A MEKC technikát alkalmazva lehetőség van arra, hogy egyszeri futtatások során rövid idő alatt határozzuk meg a TMZ-t és két további bomlástermékét, az MTIC-t és az AIC-t. Az összetevők koncentrációját a TMZ bomlása után vizes oldatban 1-13 pH értékeken határoztuk meg (a pH-t HCl, NaOH és foszfát puffer segítségével állítottuk be). Az oldatok előkészítése és a CE kapillárisba történt injektálásuk között kevesebb, mint 1 perc telt el (az oldat hőmérsékletét a minta előkészítés során 4 °C-on kellett tartani). pH 6 és 8 között a pH-ban történt kis változtatás is nagy eltérést idézett elő a három összetevő koncentrációjának eloszlásában. Számos elektroforetogram készült a TMZ oldatról pH 7,9-es értéken, különböző időtartamok elteltével, ahogyan azt a 10. ábra illusztrálja. Míg ezen a pH értéken a TMZ felezési ideje 28 perc, a MTIC-nek 13 perc, addig ez pH 9,1-es értéken 9 és 11 perc volt. A TMZ és MTIC koncentrációi gyorsan változtak, viszont az AIC 4 óra után is állandó maradt. Ezekből az adatokból arra következtethetünk, hogy az AIC állandó mennyiségei egyenlők a TMZ kezdeti koncentrációjával és sokkal nagyobbak, mint a MTIC maximális koncentrációja.



10. ábra. A TMZ, MTIC és AIC egy időben történő monitorozása humán szérumban a TMZ feloldása után. A TMZ kezdeti koncentrációja 180 $\mu\text{g/mL}$ volt.

A TMZ és bomlástermékei közel fiziológiás pH értéken jól detektálhatók, azonban jelentősen eltérő pH érték esetében csak egy összetevő mutatható ki. Alacsonyabb pH értéken a TMZ stabil, pH 12 fölött a TMZ-ből AIC-be történő konverzió gyakorlatilag azonnal lezajlik és az AIC koncentrációja szobahőmérsékleten legalább egy hétig állandó marad.

Az MTIC stabilitása szerves oldószerek alkalmazásával sem fokozható. Habár a MTIC oldódása 20/80 arányú izopropanol/metilén-klorid (v/v) oldatban magas, a stabilitása rendkívül gyenge. Egy sokkal hidrofób tulajdonságokkal rendelkező oldószer használata esetén pedig az analitokat nem lehet jól kivonni, így ennek a használata sem célravezető CE esetén.

Humán szérum vizsgálata során egyszeri 400 mg TMZ orálisan alkalmazása után 60 perccel történt a mintavétel, majd a vért azonnal cc. HCl-al savasítottuk pH 1-es értékre és a fagyasztozóba tettük ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), így a lebomlási folyamat megállt és a vér TMZ mennyisége a mintavételezési időpontnak megfelelő koncentrációt tükrözte. A TMZ legmagasabb detektált koncentrációja az analizált mintákban 14.2 $\mu\text{g/mL}$ -nek bizonyult; ez a koncentráció a c_{max} körül van. Az MTIC és AIC ekkor még csak kis mennyiségben detektálható, mert a mintavételi időpont a TMZ vérbe történő maximális abszorpciójához közeli időpontban volt és a TMZ lebontása még nem kezdődött el a gyomorban fennálló savas pH által biztosított stabilitás miatt.

A TMZ és a lebomlási termékeinek mennyisége legalább 2 hónapig állandó maradt az acidifikálás és a -20 °C-on történő tárolás után.

Az elektroferogramokat 260 nm és 325 nm-en rögzítve azt tapasztaltuk, hogy gyakorlatilag csak az AIC és a TMZ mutat abszorpciót, a szérumban komponensei nem interferálnak, így az elérhető detekciós szenzitivitás jelentős.

4.3.2. A temozolomid intratumorális koncentrációjának közvetlen meghatározása humán glioblasztómában

Amíg a szérumban minták közvetlen injektálása a szeparációs kapillárisba nem jelent gondot, addig ezt nem lehet elvégezni az agydaganat minták esetében a szilárd konzisztenciájuk miatt. További problémát jelent az is, hogy a gyógyszerek koncentrációja az agyban (a tumorban) jellemzően kisebbek, mint a szérumban, valamint az elérhető *in vivo* tumor minták igen kis mennyiséget képviselnek (kevesebb, mint 1 g). Az általunk kidolgozott új analitikai módszer, a liofilizáció és a szárított anyag ezt követő feloldása egyszerű és hatékony módszernek bizonyult arra, hogy biztosítsuk a minta homogenitását illetve, hogy feloldjuk az analitot egy megfelelő oldatban. A liofilizált tumor mintákat kis térfogatú 0,1 M-os HCl-ban (300-600 µL) oldottuk, hogy megakadályozzuk a TMZ hidrolízisét illetve, hogy az analit hígítását alacsony szinten tartsuk. Annak ellenére, hogy a kapott oldat sűrű volt, a direkt injektálás és meghatározása lehetővé vált. A TMZ csúcsa még éppen mérhető volt 165 perccel az egyszeri 400 mg-os TMZ beadása után a beteg mintájában, viszont már nem volt mérhető a többi tumoros mintákban.

Minta	A mintavétel és a TMZ bevétele között eltelt idő (min)	Liofilizáció előtti tömeg (g)	Liofilizáció utáni tömeg (g)	TMZ tartalom (µg/g)
nem tumoros agyszövet	105	0,3782	0,0748	0,0476
Tumor 1	135	0,9915	0,1047	0,0852
Tumor 2	150	0,7803	0,1217	0,0614
Tumor 3	165	0,7647	0,1211	0,117

9. táblázat. A temozolomid koncentráció humán glioblasztómában és peritumorális agyszövetben 400 mg TMZ per os alkalmazása után 105-165 perccel.

A tumor minták (9. táblázat) eredményeiből összefoglalható, hogy a TMZ képes áthaladni a vér-agy gáton, de a csúcskoncentráció az analizált tumormintákban nem magasabb, mint 0,12 µg/g.

4.4. Az EGFR és az integrinek kölcsönhatásának szerepe asztrocitómákban

4.4.1. Az ErbB1 (EGFR) és az integrin- β 1 közti molekuláris interakció vizsgálata asztrocitómákban

Az immunfluoreszcenciás módon jelölt szöveti metszetek korrigált átlagos fluoreszcencia intenzitásának mérése során az integrin- β 1 molekula expressziója esetén a IV-es grádusú tumorok esetén szignifikánsabban magasabb értékeket detektáltunk, mint a II-es grádusú tumorokban ($p = 0,038$). Az ErbB1 expressziós szintje nem különbözött szignifikánsan a két csoport között ($p = 0,379$).

A különböző grádusú daganatokban azonban az ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociáció nagyfokú különbséget mutatott ($p < 0,001$), mellyel összefüggésben a lépésenkénti bináris logisztikus regresszió - a vizsgált paraméterek közül - ezt, mint a tumor grádust meghatározó egyedüli paraméterként azonosította (ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociáció odds ratio = 8716). Továbbá a többszörös lépésenkénti lineáris regresszió során a FRET hatásfok mértékét mindkét grádusú csoport esetén összesítve (Gr. II és Gr. IV), illetve a IV-es grádusú csoport esetén külön is ($p = 0,094$ és $0,085$) a relapszus-mentes idővel konkordánsan változónak találtuk. Ugyanezen technikával elemezve a II-es és IV-es grádusú minták túlélési idejét, azt találtuk, hogy az ErbB1-integrin- β 1 interakció mellett ($p < 0,001$) az integrin- β 1 expresszió szintje is szignifikánsan ($p = 0,05$) hozzájárul a túlélés előrejelzéséhez.

A II-es grádusú daganattal rendelkező betegek nagy többsége több évet élt a sebészeti beavatkozás után. Ebben a csoportban 5-en kaptak radioterápiát, a daganat méretére, lokalizációjára és posztoperatív recidívájára alapozva. Ezen daganatok közül mindegyik recidívált, az egyik (T80') malignus glioblasztomává transzformálódott. Az OS 16-82 hónap között alakult. A nem irradiált II-es grádusú asztrocitómák közül 3 újult ki, a T33 és a TC416, 48 és 33 hónap után, a túlélésük pedig > 6 év és 40 hónap volt. A T86/B kiújulása a sebészeti beavatkozástól számítva 14 hónap volt, míg túlélése 16 hónap. Megemlítendő, hogy a legrövidebb túléléssel rendelkező T86/B asztrocitóma és a IV-es grádusúvá átalakult T80' minták mutatták a legmagasabb ErbB1-integrin- β 1 expressziót a II-es grádusú daganatok között (10. táblázat).

A IV-es grádusú daganattal rendelkező betegek mindegyike részesült radioterápiában. Ebben a csoportban minden egyes betegnél recidíva jelent meg: 7 beteg esetében 6 hónapon belül, 2 beteg esetében (T71, T74) pedig 12-13 hónapon belül. A T10/B beteg esetében csak a biopsziás mintavétel volt kivitelezhető. A 2 legkorábbi kiújulású (2 hónap, T53 és T82) és

legrövidebb túléléssel (4 hónap) rendelkező betegek mintáiban volt a legmagasabb az ErbB1 és integrin- β 1 expressziós szint és ezekben a mintákban volt megfigyelhető a legnagyobb ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociáció. A legalacsonyabb ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociációt a T71-es jelzésű beteg esetében tapasztaltuk. Ez a daganat többször kiújult, összesen 3 alkalommal került műtetre és minden sebészi beavatkozás után sugárkezelésben részesült, a túlélése 40 hónap volt, ellentétben az átlagosan kevesebb, mint 6 hónap recidíva-mentes és 4-16 hónapos teljes túléléssel, ami várható lett volna a többi hasonló grádusú daganat értékei alapján.

Kaplan-Meier analízist végeztünk a teljes és a progresszió-mentes túlélés összehasonlítására a II-es és IV-es grádusú csoportok esetében, illetve azokban a csoportokban is, ahol a minták csoportosításának alapját az képezte, hogy a minták expressziós értékei alatta vagy felette helyezkednek el az ErbB1, integrin- β 1 molekulák átlagos expressziós értékeinek. Az ErbB1-integrin- β 1 FRET hatásfok értékek átlagánál alacsonyabb, illetve magasabb szintű heteroasszociációs esetek is külön csoportot képeztek az analízis során. A túlélést egyaránt jól határozta meg a hisztopatológiai gradálás továbbá az ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociáció ($p < 0,001$), míg az ErbB1 és integrin- β 1 expressziós értékek kisebb mértékben, de szintén szignifikánsnak bizonyultak ($p = 0,014$, $p = 0,004$). Hasonló megfigyeléseket tettünk a PFS-re is: $p < 0,001$ érték mutatkozott a grádusra, az integrin- β 1 expresszióra és heteroasszociációra vonatkozóan és $p = 0,014$ az ErbB1 expresszióra vonatkozóan.

No.	Minta sorszáma	Terápia	Kiújulásig eltelt idő	Túlélés
Astrocytoma, Gr. II.				
II./1.	T33	Op+Op	48 hónap	>82 hónap (még él)
II./2.	T34	Op+Rx	50 hónap	77 hónap
II./3.	T59	Op+Rx	reziduális tumor	42 hónap
II./4.	T80'	Op+Rx+Op+Op	15 hónap	31 hónap
II. / 5.	T86/B	Op+T	14 hónap	16 hónap
II./6.	TC515	Op	-	>34 hónap (még él)
II./7.	TC416	Op	33 hónap	>40 hónap (még él)
II./8.	TC497	Op+Op+Rx	32 hónap	>36 hónap (még él)
II./9.	TC326 ^a	Op+Op	-	>41 hónap (még él)
II./10.	TC493	Op+Rx	3 hónap	16 hónap
Astrocytoma, Gr. IV. Glioblastoma multiforme				
IV./1.	T10/B	Op+Rx	biopszia	10 hónap
IV./2.	T32	Op+Rx	4 hónap	7 hónap
IV./3.	T53	Op+Rx+Op+T	2 hónap	4 hónap
IV./4.	T65	Op+Rx+Op	4 hónap	8 hónap
IV./5.	T67	Op+Rx	4 hónap	7 hónap
IV./6.	T71	Op+Rx+Op+Rx+Op	12,12, 6 hónap	40 hónap
IV./7.	T74	Op+Rx	13 hónap	16 hónap
IV./8.	T75*	Op+Rx	4 hónap	10 hónap
IV./9.	T76*	Op+Rx+BCNU	4 hónap	8 hónap
IV./10.	T82	Op+Rx	2 hónap	4 hónap

10. táblázat. A vizsgált asztrocitómás betegek klinikai adatai. BCNU (carmustin) = kemoterápia; Op = operáció, Rx = radioterápia, T = temozolomid kemoterápia.

*A TC326-os beteg esetében, ebben a tanulmányban a követés a második operáció után kezdődött. Az első műtét 7 évvel korábban történt

4.4.2. Az EGFR mutáció szerepének vizsgálata rekurrens glioblasztómában

Az EGFR gén amplifikációja és az EGFR fehérje fokozott expressziója

A betegeket FISH+ (amplifikáció vagy nagyfokú poliszómia) és FISH- (diszómia, alacsony fokú triszómia, magas fokú triszómia és alacsony fokú poliszómia) csoportokban osztottuk. Diszómia igazolódott ≤ 2 minta esetében a sejtek > 90 %-ában, alacsony fokú triszómia igazolódott ≤ 2 minta esetében a sejtek ≥ 40 -ában, 3 esetben a sejtek 10-40 %-ában,

≥ 4 esetben pedig a sejtek $< 10\%$ -ánál, magas fokú triszóma mutatkozott ≤ 2 esetben a sejtek $\geq 40\%$ -ában, 3 esetben a sejtek $\geq 40\%$ -ában, ≥ 4 esetben a sejtek $< 10\%$ -ában, magas fokú poliszómia igazolódott ≥ 4 esetben a sejtek $10\text{--}40\%$ -ában.

Gén amplifikáció igazolódott az EGFR gén klaszterek megjelenésének formájában vagy az EGFR gén és a 7-es kromoszóma arányának számításával ≥ 2 alkalommal.

Összességében a 20 esetből 10 FISH+ (50%) volt. EGFR amplifikációt 7 esetben találtunk (35%), nagyfokú poliszómiát pedig 3 daganat esetében (15%).

Az EGFR fehérje fokozott expresszióját találtuk 13 esetben (65%), mely 7 esetben együtt volt megfigyelhető az EGFR gén amplifikációjával és három esetben nagyfokú poliszómiával. A fennmaradó három esetben sem amplifikációt sem nagyfokú poliszómiát nem tudtunk igazolni.

EGFR szekvencia analízis

Az EGFR gén 18-21-es exonjai nem mutattak mutációt. Minden esetben megtartott állapotú DNS szekvenciát találtunk.

4.5. Agyi áttéti daganat és gliómák invazivitásának összehasonlítása

4.5.1. mRNS expressziós eredmények

1. fázis

Az első fázisban az irodalmi áttekintés alapján összeválogatott, tumoros invázióban szerepet játszó 96 molekula mRNS expressziós szintjét határoztuk meg GBM, tüdő adenokarcinóma agyi áttéti és peritumorális agyszövet mintákon. A mérések alapján határoztuk meg azoknak a molekuláknak a körét, melyek a tapasztalt eltérések alapján nagyobb számú szövetmintán való további vizsgálatra is érdemesnek találtunk (inváziós panel).

2. fázis

Az ezt követő fázisban GBM és a tüdő adenokarcinóma esetében az inváziós panel 23, peritumorális infiltrációban szerepet játszó ECM-komponensből állt. A 23 molekulából 17 tartozott a PG-k közé, a további 6 vizsgált molekula pedig az enzimeket képviselte. A fentieken

kívül szintén meghatároztuk tumorspecifikus markerként a GFAP és a citokeratin-18,19 valamint proliferációs markerként a Ki67 mRNS expresszióját (11. táblázat).

A tumormarkerek a megfelelő daganattípusra jellegzetesen minden minta esetében jelentős különbséget illetve specifikus mRNS-emelkedettséget mutattak, ami a minták eltérő szövettani típusát egyértelműen megerősítették. A Ki67 minden esetben egymáshoz hasonló magas értéket eredményezett, bizonyítva ezzel a minták magas proliferációs aktivitását és a szövetminta megfelelően sejtdús – és nem nekrotikus jellegét.

Gén	GBM – Met	
	fold change	p value
Brevikán	128,33	0,0290
Fibronectin	1,90	0,6860
Laminin alfa 1	4,11	0,1140
Laminin alfa 2	2,80	0,0570
Laminin alfa 4	2,77	0,1140
Laminin beta 1	2,90	0,0570
Laminin beta 2	1,10	0,8860
Laminin gamma 1	0,96	1,0000
Neuroglikán C	15,19	0,0250
Neurokán	21,36	0,0290
Perlekán	0,56	0,3430
Szindekán 1	0,07	0,0290
Szindekán 2	3,71	0,0290
Szindekán 4	0,14	0,0290
Tenaszcín C	5,77	0,0290
Tenaszcín R	10,43	0,1140
Verzikán	3,87	0,0290
Hilauronsav szintáz 1	1,09	0,8860
Hilauronsav szintáz 2	3,36	0,3430
Hilauronsav szintáz 3	2,28	0,2000
Mátrix metalloproteináz 2	4,67	0,0290
Mátrix metalloproteináz 8	0,57	0,6860
Mátrix metalloproteináz 9	1,85	0,6860
Citokeratin 18	0,0037	0,0290
Citokeratin 19	0,0006	0,0290
GFAP	19,52	0,0290
Ki-67	0,79	0,6860

11. táblázat. Huszonhárom, tumoros környezeti infiltrációban szerepet játszó extracelluláris mátrix-komponens mRNS expressziós szintjének összehasonlítása glioblasztómában és tüdő adenokarcinóma agyi áttétében, tumor- és proliferációs markerekkel kiegészítve. (A szignifikáns különbségek vastag betűvel kiemelve)

A két különböző eredetű daganatban mért mRNS expressziós értékek összehasonlítása során a GBM mintákban az adenokarcinóma áttétéhez képest szignifikánsan magasabb szintet mértünk a brevikán, a neurokán, a neuroglükán-C, a szindekán-2, a tenaszcin-C, a verzikán, és az MMP-2 esetében.

A szindekán-1 és 4 mRNS expressziós szintje az áttéti daganatban bizonyult statisztikailag igazolhatóan magasabbnak.

A fibronectin, a perlekán, a szindekán-2, a laminin- α 1,2,4, β 1,2, γ 1, a hialuronan-szintáz 1,2,3, az MMP-8 és 9 mRNS szintjeinek esetében nem volt szignifikáns különbség a GBM és az áttéti daganat között.

3. fázis

A harmadik fázisban harminc szövetmintát vizsgáltunk három különböző homogén szövetcsoportban: 11 GBM mintát, melyek a tumor marginális zónájából származtak, további 10 mintát intracerebrális tüdő adenokarcinóma metasztázisból, 9-et pedig normál agyszövetből. A statisztikai analízis eredményeit a 34 molekulából álló inváziós panel mRNS expresszió különbségei tekintetében a vizsgált mintacsoportok között a 12. táblázatban foglaltuk össze.

A tumormarkerek és a Ki67 proliferációs marker mRNS expressziója megerősítette a szövettani diagnoszt.

A) GBM versus normál agyszövet

Az agrin, fibronectin, laminin α 4, β -1, β -2, perlekán, szindekán-1, tenaszcin-C, CD44, CD168, HAS-2, MMP-2 és -9 mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett volt GBM-ban összehasonlítva a normál agyszövettel, miközben a szindekán-4, tenaszcin-R és HAS-1 mRNS expressziója statisztikailag alacsonyabb volt GBM-ban. Az aggregán, brevikán, laminin α -1, -2, laminin β -1, laminin γ -1, matrilin-1, -2, neurokán, neuroglükán, szindekán-2, verzikán, kondroitinases, HAS-3 és MMP-8 mRNS szintjei nem különböztek lényegesen a normál agyszövetben és GBM-ban.

B) Intracerebrális tüdőeredetű adenokarcinóma metasztázis és normál agyszövet

Jelentősen csökkent mRNS expressziót mértünk brevikán, laminin α -1, matrilin-2, neurokán, neuroglükán-C, szindekán-2, tenaszcin-R és HAS-1 esetében a tüdő adenokarcinóma metasztázisban a normál agyszövettel összevetve. Ezzel szemben az agrin, fibronectin, laminin β -1, β -2, γ -1, perlekán, szindekán-1, -4, CD168 és MMP-9 mRNS szintje statisztikailag

magasabb volt a metasztatikus tumorban a normál agyszövethez viszonyítva. Nem volt látható különbség az aggregán, laminin α -2, -4, matrilin-1, tenascin-C, verzikán, CD44, kondroitinázok, HAS-2, -3, MMP-2 és -8 mRNS szintjét tekintve a két szövettípus között.

	Norm - Met		Norm - GBM		GBM – Met	
	<i>p érték</i>	<i>fold change</i>	<i>p érték</i>	<i>fold change</i>	<i>p érték</i>	<i>fold change</i>
aggregán	0,421	0,79	0,421	0,39	1,000	2,01
agrin	0,002	0,30	0,012	0,44	0,218	0,67
brevikán	<0,001	172,46	0,820	1,27	<0,001	135,66
fibronektin	<0,001	0,08	<0,001	0,09	0,916	0,87
laminin alfa-1	0,032	4,55	0,548	2,98	0,421	1,53
laminin alfa-2	0,310	1,84	0,841	0,82	0,222	2,24
laminin alfa-4	0,713	0,85	0,023	0,47	0,098	1,79
laminin beta-1	0,020	0,36	0,001	0,27	0,379	1,33
laminin beta-2	0,020	0,44	0,005	0,34	0,130	1,29
laminin gamma-1	0,016	0,29	0,222	0,38	1,000	0,76
matrilin-1	0,548	1,69	0,310	2,34	1,000	0,72
matrilin-2	0,002	6,07	0,761	0,90	<0,001	6,72
neurokán	<0,001	44,76	0,095	2,29	0,001	19,50
neuroglükán-C	<0,001	46,94	0,058	3,15	<0,001	14,89
perlekán	<0,001	0,08	<0,001	0,12	0,342	0,70
szindekán-1	<0,001	0,01	0,008	0,23	<0,001	0,06
szindekán-2	0,008	3,27	1,000	1,44	0,151	2,27
szindekán-4	0,020	0,41	0,048	1,53	0,008	0,27
tenascin-C	0,348	0,40	0,006	0,06	0,007	6,91
tenascin-R	<0,001	136,10	<0,001	10,53	0,018	12,92
verzikán	0,596	1,27	0,289	0,56	0,307	2,29
CD44	0,094	0,39	0,003	0,15	0,012	2,70
CD168	<0,001	0,06	<0,001	0,12	0,053	0,46
kondroitinases (AC,ABC)	0,222	0,77	0,841	0,95	0,690	0,81
hialuronan synthase-1	<0,001	26,98	<0,001	33,55	0,504	0,80
hialuronan synthase-2	0,838	0,77	0,002	0,11	0,003	6,84
hialuronan synthase-3	0,421	1,75	0,690	0,83	0,222	2,10
MMP-2	0,131	0,37	0,004	0,15	0,032	3,08
MMP-8	1,000	0,89	0,857	1,50	0,310	0,60
MMP-9	0,001	0,06	<0,001	0,05	0,805	1,11
citokeratin 18	0,008	0,002	0,310	0,72	0,008	0,003
citokeratin 19	0,008	0,003	0,151	4,49	0,008	0,001
GFAP	0,016	33,31	0,548	0,73	0,008	45,61
Ki67	0,008	0,01	0,008	0,01	0,548	0,82

12. táblázat. Jelentős különbségek (vastagon szedve) a 30, ivázióval összefüggésbe hozható molekula és a 4 tumormarker mRNS expressziója között glioblasztómában (GBM), tüdő adenokarcinóma agyi metastaisában (Met) és a normál agyszövetben (norm).

C) GBM és tüdő adenokarcinóma metasztázis

A különböző eredetű anaplasztikus tumorokat összehasonlítva, az mRNS expresszió brevikán, matrilin-2, neurokán, neuroglükán-C, tenascin-C és R, CD44, HAS-2 és MMP-2 esetében jelentősen magasabb volt GBM-ben mint tüdő adenokarcinóma metasztázisban. A szindekán-1 és szindekán-4 transzkriptumai lényegesen emelkedtek az adenokarcinóma agyi áttétje esetében. Nem észleltünk statisztikailag jelentős különbségeket agrin, aggregán, fibronectin, laminin α -1, -2 or -4, laminin β -1, -2, laminin γ -1, matrilin-1, perlekán, szindekán-2, verzikán, CD168, kondroitináz, HAS-1 és -3, vagy MMP-8, és -9 esetében.

4. fázis

A negyedik lépésben elvégzett mérések során három különböző eredetű és dignitású tumor eredményeit hasonlítottuk össze egymással és a peritumorális agyszövet eredményeivel.

Összehasonlítva a génexpressziót a NSCLC agyi áttétjében és a II-es grádusú asztrocitómában a kadherin-3, kollagén type I, III és IV, fibronectin, perlekán, szindekán-1 és -4 és a MMP-9 expressziója volt jelentősen magasabb a metasztázisban. Ezzel szemben, a brevikán, kadherin-2, laminin alpha-4, beta-2, matrilin-2, neurokán, szindekán-3, tenascin-C és -R, verzikán, HAS-2, és MMP-2 szintjeit az asztrocitómában találtuk magasabbnak.

A NSCLC agyi áttétjeiben magasabb mRNS szinteket találtunk kadherin-3, neurokán, szindekán-1 és MMP-9 tekintetében, összevetve a schwannomával, míg a schwannomában magasabb volt a kadherin-2, kollagen IV, VIII, laminin alpha-4, beta-1 és beta-2, matrilin-2, neuroglükán-C, perlekán, szindekán-3, HAS-2 és MMP-2 szintje.

Összehasonlítva a schwannoma és az asztrocitóma mintákat, a kollagen alpha -1, kollagen III, IV és VIII, fibronectin, perlekán, matrilin-2, szindekán-4, laminin alpha-4, beta-1 és beta-2 magasabbnak találtatott schwannomában, míg a brevikán, neuroglükán-C, tenascin-C és -R, neurokán és verzikán inkább az asztrocitómában expresszáldott.

Az asztrocitóma minták és a normál agyszövetből valók összehasonlítása feltárta, hogy az agrin, brevikán, kadherin-2, kollagen type I, III, IV, fibronectin-1, laminin alpha-4 és beta-2, matrilin-2, neurokán, perlekán, szindekán-3, tenascin-C, verzikán, HAS-2, és MMP-2 és -9 mRNS szintjei jelentősen magasabbak voltak az asztrocitóma mintákban. Ezzel ellentétben a szindekán-4 és a HAS-1 mRNA szintjei a normál agyszövetben bizonyultak magasabbnak.

A schwannoma mintákban az agrin, a kollagén I, III IV és VIII típusok, a fibronectin, laminin alpha-4, beta-1 és beta-2, matrilin-2, perlekán, szindekán-3 és -4, HAS-2 és MMP-2 mRNS értékeit mértük magasabbnak a normál agyszövethez viszonyítva, míg a normál agyból

vett mintákban a brevikan, neurokan, neuroglikan-C és tenascin-R mRNS-ek magasabb értékeit rögzítettük.

Az agrin, kadherin-3, a kollagen I, III, IV és VIII típusok, a fibronectin, a laminin beta-1 és beta-2, perlekan, szindekan-1 és -4, valamint a MMP-9 mRNS szintje szignifikánsan magasabb volt az agyi metasztázisokban, mint a normál agyszövetben. Ezzel ellentétben a brevikan, kadherin-2, neurokan, neuroglikan-C, matrillin-2, szindekan-3, tenascin-R és a HAS-1 sokkal alacsonyabb volt a metasztázisokban, mint a normál agyszövetben.

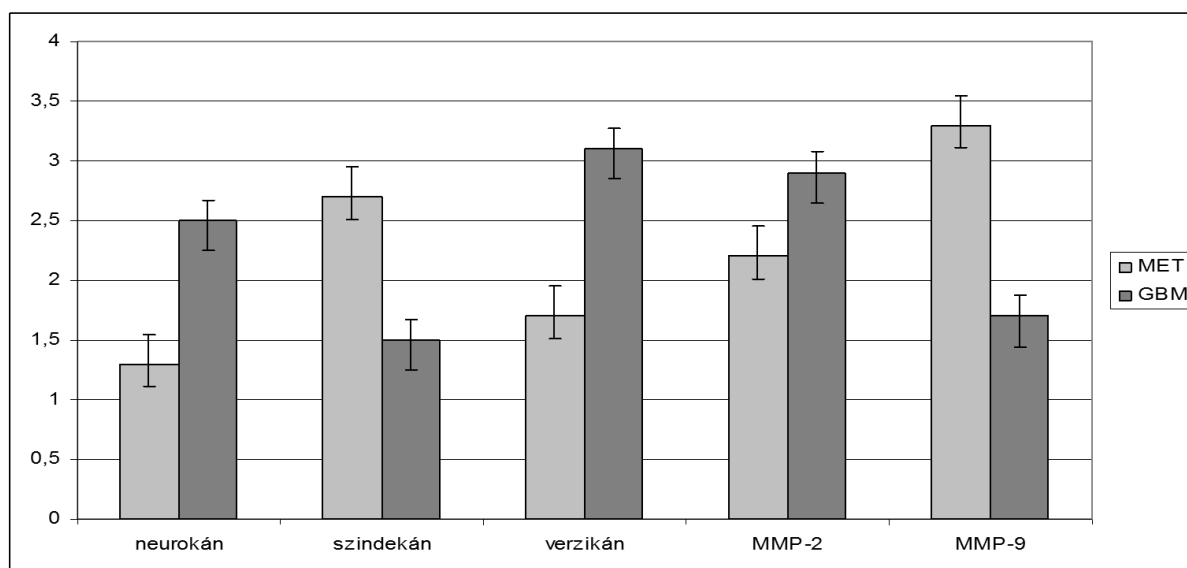
4.5.2. Immunhisztokémiai eredmények

1. fázis

Az első fázisban nem végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatokat.

2. fázis

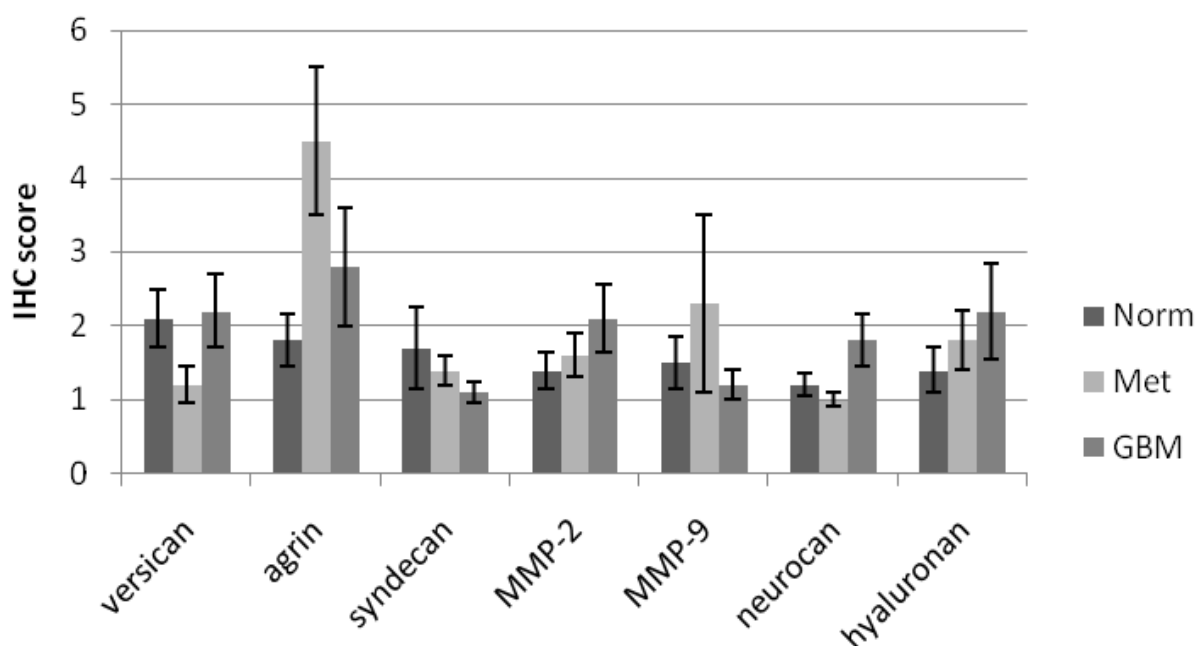
Öt molekula esetében (neurokan, verzikan, szindekan MMP-2 és 9) vizsgáltuk az immunhisztokémiai reakció intenzitását. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a neurokan, a verzikan és a MMP-2 esetében a glioblasztómában az áttéti daganathoz képest egyértelműen magasabb értékeket állapítottunk meg. A szindekan és az MMP-9 az adenokarcinómában mutatott intenzívebb festődési reakciót (11. ábra).



11. ábra. Immunhisztokémiai reakciók szemi-kvantitatív eredménye glioblasztómában (GBM) és tüdő adenokarcinóma agyi áttétében (MET). Minden metszeten három különböző területen 0-4-ig osztályoztuk a festődési intenzitást, majd eredményeinket átlagolva jutottunk a végleges értékekhez

3. fázis

A harmadik fázisban GBM, adenokarcinóma áttét és peritumorális agyszövetmintákon végeztünk immunhisztokémiai festést és összehasonlító elemzést 7 molekulára vonatkozóan: agrin, hialuronan, neurokán, szindekán, verzikán, MMP-2 és 9. Az immunhisztokémiai és HA hisztokémiai reakciókat a 12. ábrán foglaltuk össze. A morfológiai értékelésnek megfelelően az immunreaktivitás a legkifejezettebb az agrin, neurokán, szindekán és verzikán esetében a sejtmembránon és az extracellularis térben volt, míg a MMP-k erős immunoreaktivitást mutattak a sejtmembránon és intracellularisan. A legerősebb immunfestődés az agrin, szindekán és MMP-9 esetében a tüdő adenokarcinóma metasztázisban volt megfigyelhető, míg a MMP-2, neurokán és hialuronan a legmagasabb értékeket GBM mintákban mutatta. A tumor markerek és a Ki-67 festődési intenzitása megfelelt a kórszövettani diagnózisnak.



12. ábra. Négy proteoglikán, két MMP és a hialuronsav immunhisztokémiai festődési intenzitása glioblasztómában (GBM) intracerebrális tüdő adenokarcinóma metasztázisban (Met) és normál agyszövetben (Norm). A reakciókat 1-5-ig felállított score szerint három különböző régióban határoztuk meg. Az egyes régiókból nyert score-okat összehasonlítás céljából átlagoltuk

4. fázis

A vizsgálatunk utolsó fázisában négy különböző szövettani csoportban (II-es grádusú asztrocitóma, adenokarcinóma agyi áttéte, schwannoma és peritumorális agyszövet) végeztünk IHC festést négy molekula esetében: brevikan, neurokán, tenascin-C és verzikan.

A brevikan, neurokán, tenascin-C és a verzikan immunreaktivitása a legintenzívebb volt a sejtmembránon és az extracelluláris térben. A legintenzívebb festődést minden molekula esetében az asztrocitóma szövetekben észlelték. A normál agyszövetben kevésbé kifejezett immunfestődést találtunk neurokán, tenascin-C és verzikan esetében, a schwannoma minták pedig gyengébb immunfestődést mutattak brevikan és neurokán tekintetében. A metasztatikus szövetek mutatták verzikan esetében a leghalványabb immunfestődést. A tenascin-C festődés nagyon gyenge volt mind a schwannomában, mind NSCLC-ben. A tumormarkerek és a Ki-67 festődési intenzitása összhangban állt a hisztológiai diagózissal.

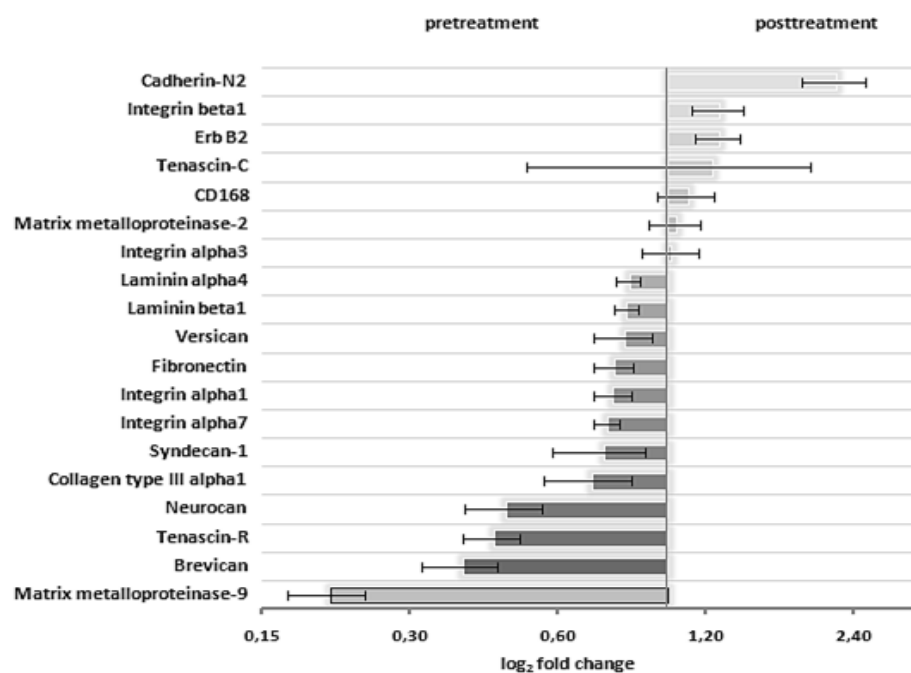
4.6. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára

4.6.1. RNS expressziós eredmények

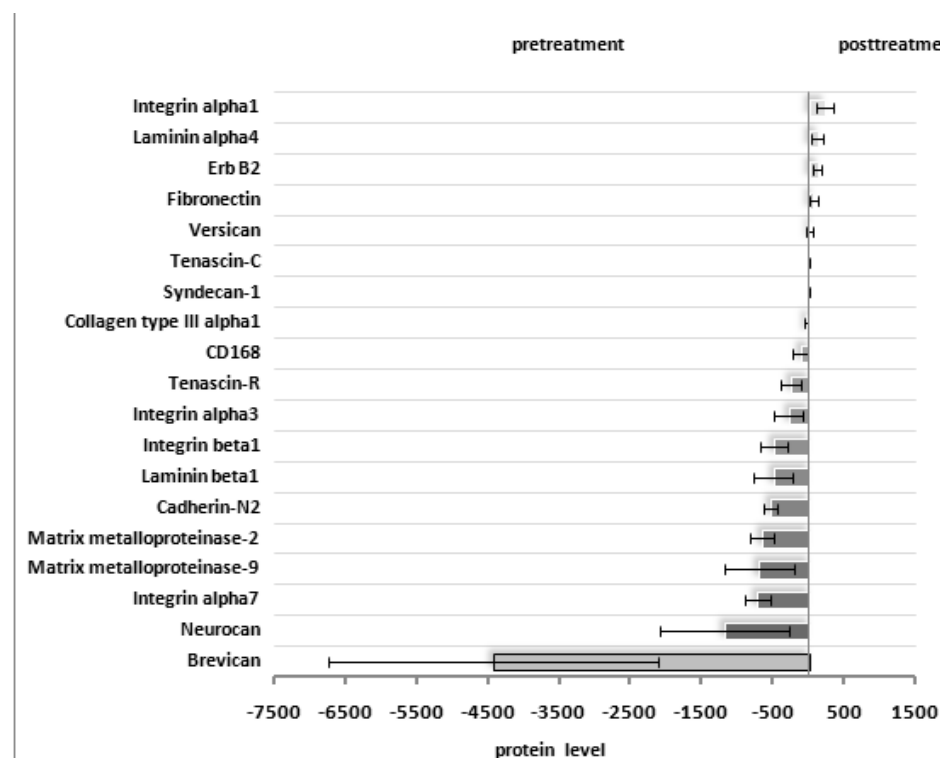
A konkuráló kemo-irradiációs kezelés előtti és utáni GBM szövetminták esetében a génexpresszió összehasonlítása során a kezelt mintákban a 19 vizsgált molekulából 12 molekula RNS szintje csökkent (brevikan, kollagen type III alpha1, fibronectin, integrin alpha1, integrin alpha7, laminin alpha4, laminin beta1, MMP-9, neurokán, szindekan1, tenascin-R, verzikan), míg 7 molekula transzkriptumában láttunk emelkedést (kadherin N2, CD168, erbB2, integrin alpha3, integrin beta1, matrix metalloproteinase-2, tenascin-C), (13. ábra).

4.6.2. Proteomikai eredmények

Kvantitatív fehérje vizsgálatral 2 molekula esetében (szindekan-1, tenascin-C) nem kaptunk értékelhető eredményt, 12 vizsgált fehérje szintje csökkent (brevikan, kadherin N2, CD168, kollagén type III alpha1, erbB2, integrin alpha3, integrin alpha7, integrin beta1, laminin beta1, MMP-2, MMP-9, neurokán, tenascin-R) 5 génnél pedig a fehérje koncentráció növekedését tapasztaltuk (erbB2, fibronectin, integrin alpha1, laminin alpha-4, verzikan), (14. ábra).



13. ábra. A vizsgált extracelluláris-mátrix molekulák (inváziós panel) RNS expressziójának *fold change* változása onkoterápia előtti valamint utáni glioblasztóma mintákban $\log_2$ skálán feltüntetve. A balra mutató sávok magasabb kezelés előtti szintet jelentenek, míg a jobbra mutatók onkoterápia utáni magasabb expressziót. A szignifikáns változást világosszürke színnel jelöltük



14. ábra. A vizsgált extracelluláris mátrix molekulák (inváziós panel) fehérje szintű mennyiségi változásai (*fold change*, $\log_2$ skálán feltüntetve) kezeletlen és konkuráló kemo-irradiációban részesült glioblasztóma mintákban. A molekulák a változás mértékének sorrendjében szerepelnek. A balra irányuló vonalak a kezelés előtti magasabb szintet, a jobbra irányuló vonalak a kezeléseket utáni magasabb szintet jelentik. A szignifikáns változást világosszürke színnel jelöltük

A expressziós változásokat RNS és fehérje szinten együtt elemezve 8 esetben látható konkordáns változás (13. táblázat). A brevikán, kollagén type III alpha1, integrin alpha7, laminin beta1, MMP-9, neurokán, tenaszcin-R a kezelt mintákban mindkét vizsgálatban konzekvens expressziócsökkenést mutat, ezzel ellentétben az erbB2-nél a transzkripció és a transláció során is expresszióemelkedés volt megfigyelhető. A statisztikai elemzések során az eltérések mindössze 2 esetben bizonyultak szignifikánsnak: RNS szinten a MMP-9 (*fold change*: 0,21, p érték: 0,006 95%-os CI: [0,13] - [0,26]), protein szinten pedig a brevikán (protein szint: -4432,44, p érték: 0,006 95%-os CI: [-8857,43] - [-7,46]) csökkent szignifikáns mértékben az onkoterápiát követően.

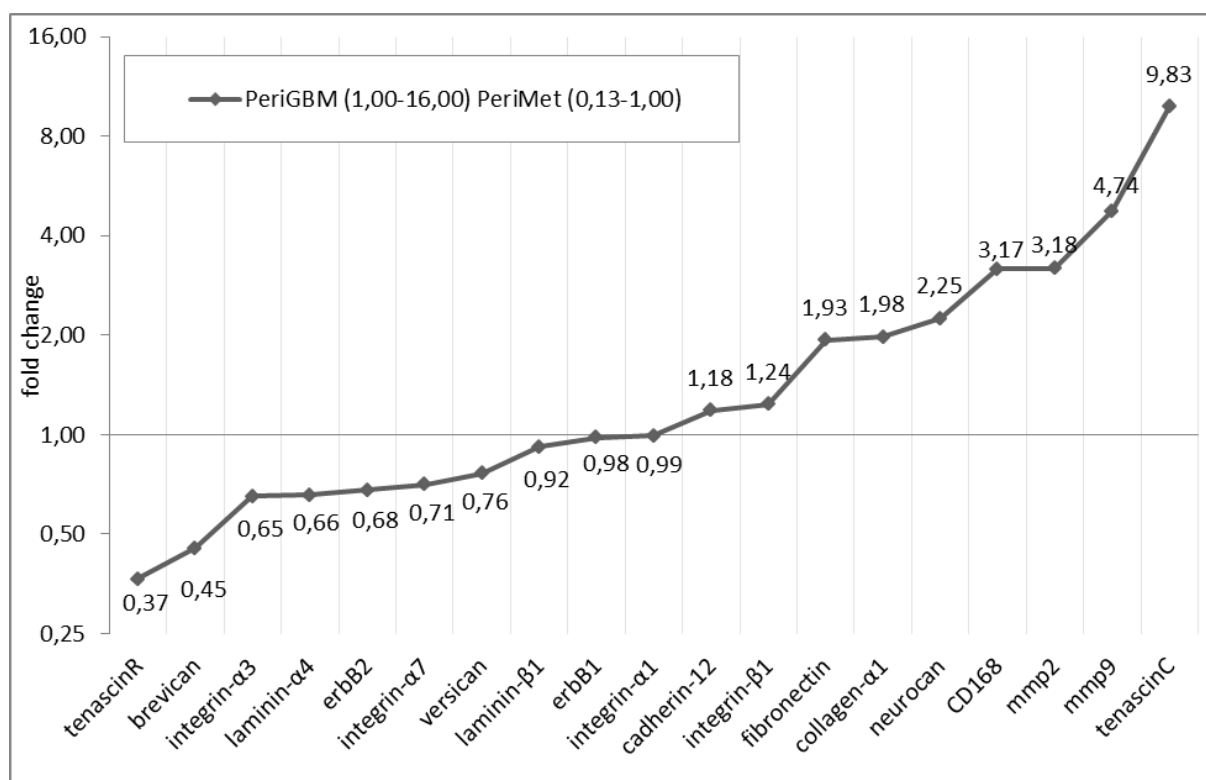
Molekula	RNS		Fehérje		RNS	Fehérje
	fold change	p érték	fehérje szint	p érték		
Matrix metalloproteinase-9	0,21	0,006	-696,52	0,767	↓	↓
Brevikán	0,38	0,149	-4432,44	0,006	↓	↓
Tenaszcín-R	0,44	0,260	-248,43	0,597	↓	↓
Neurokán	0,47	0,244	-1174,38	0,716	↓	↓
Kollagén type III alpha1	0,70	0,540	-35,47	0,806	↓	↓
Szindekán-1	0,74	0,678	0,00	0	↓	-
Integrin alpha7	0,75	0,161	-720,12	0,113	↓	↓
Integrin alpha1	0,78	0,228	218,80	0,575	↓	↑
Fibronectin	0,78	0,395	68,87	0,753	↓	↑
Verzikán	0,82	0,859	1,70	0,909	↓	↑
Laminin beta1	0,83	0,185	-499,08	0,223	↓	↓
Laminin alpha4	0,84	0,374	124,27	0,766	↓	↑
Integrin alpha3	1,02	0,621	-279,55	0,307	↑	↓
Matrix metalloproteinase-2	1,04	0,859	-660,13	0,093	↑	↓
CD168	1,10	0,737	-116,92	0,482	↑	↓
Tenaszcín-C	1,24	0,984	0,00	0	↑	-
Erb B2	1,27	0,429	121,35	0,503	↑	↑
Integrin beta1	1,28	0,199	-496,82	0,112	↑	↓
Kadherin-N2	2,20	0,334	-538,95	0,166	↑	↓

13. táblázat. A vizsgált extracelluláris mátrix molekulák (inváziós panel) RNS és fehérje szintű expresszióváltozásai kezeletlen valamint sugár- és kemoterápia utáni glioblasztóma mintákban. A világosszürke sorok az RNS és fehérje szinten is egyirányú változást mutató molekulákat jelölik, a fekete háttérrel kiemelés pedig a szignifikáns változást jelenti

4.7. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban

4.7.1. RNS expressziós eredmények

A peri-GBM és peri-Met összehasonlításban tíz molekula mutatott relatív expressziónövekedést a peri-metasztatikus szövetben: brevikán, ErbB1, ErbB2, integrin alfa-1, alfa-3, alfa-7, laminin alfa-4, beta-1, tenascin-R, verzikán. Kilenc gén esetében volt megfigyelhető fokozott expresszió GBM peritumorális mintáiban: N-kadherin-2, kollagén alfa-1, fibronectin, CD168, integrin beta-1, mátrix metalloproteináz-2 (MMP-2), MMP-9, neurokán, tenascin-C. Két esetben találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést: a tenascin-C (95% CI: 7,95-12,92) és a CD168 (95% CI: 2,75-4,64) expressziója szignifikánsan magasabb volt peri-GBM-ben peri-Met-hez viszonyítva (15. ábra).



15. ábra. Az invázióval összefüggésben vizsgált molekulák (inváziós panel) mRNA expressziós *fold change* változása log2 alapú skálán glioblasztóma melletti agyállomány (peri-GBM) és áttéti daganat melletti agyállomány (peri-Met) szövetekben. A molekulák a kapott értékek növekvő sorrendjében szerepelnek. Az 1,00 alatti érték peri-Met-ben lévő fokozott expressziót, míg az 1,00 feletti érték peri-GBM-ben lévő fokozott expressziót jelent

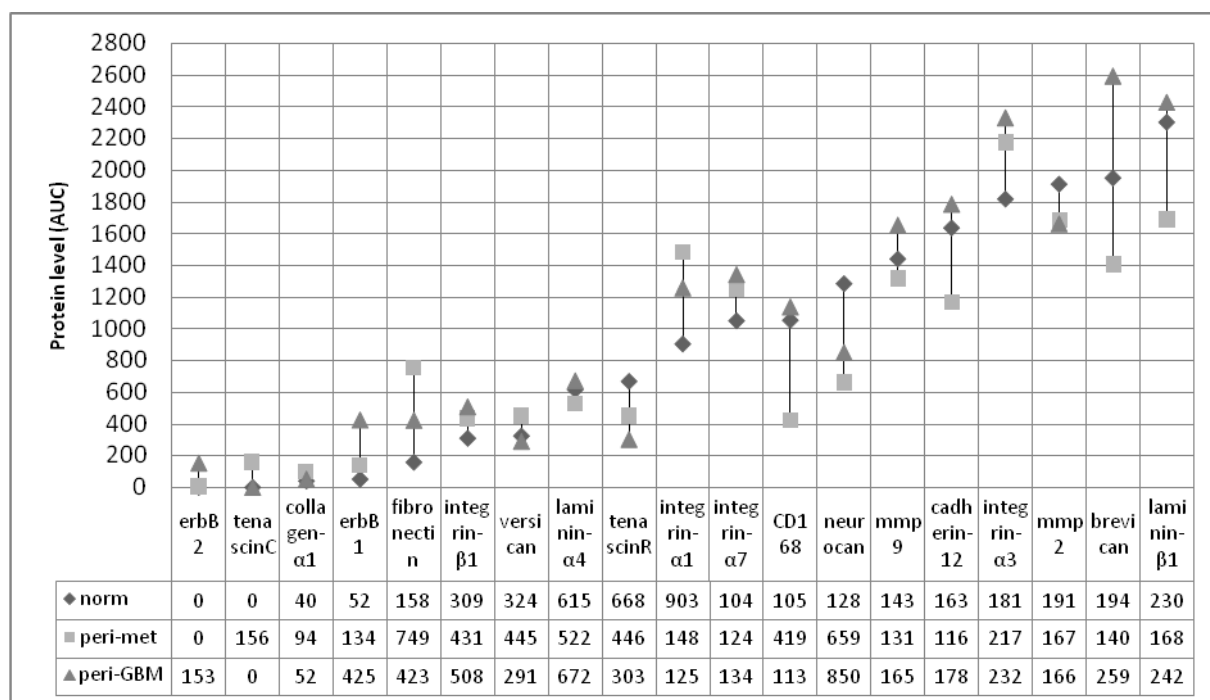
A peri-GBM mintákat a Norm szövethez viszonyítva 14 esetben volt peritumorálisan expresszió emelkedés: N-kadherin-2, kollagén alfa-1, ErbB1, ErbB2, fibronectin, CD168, integrin alfa-1, alfa-3, beta-1, laminin beta-1, MMP-2, MMP-9, neurokán, tenascin-C, de csak a CD168 (95% CI: 0,30-0,44) esetében volt statisztikailag szignifikáns az eltérés. 5 gén expressziója csökkent peri-GBM-ben nem tumoros agyszövethez viszonyítva: brevikan, integrin alfa-7, laminin alfa-4, tenascin-R, verzikan, mely közül csak a tenascin-R (95 % CI: 1,40-5,11) csökkenése bizonyult szignifikánsnak.

Összehasonlítva a peri-Met és a Norm mintákat 13 molekula mRNS szintjénél találtunk peri-Met emelkedést: brevikan, kollagén alfa-1, ErbB1, ErbB2, CD168, integrin alfa-1, integrin alfa-3, integrin alfa-7, integrin beta-1, laminin alfa-4, laminin beta-1, MMP-9, verzikan. Emellett mindössze hat gén szintje csökkent a peritumorális szövetben Norm-hoz viszonyítva: N-kadherin-2, fibronectin, MMP-2, neurokán, tenascin-C, tenascin-R. Ebben az összehasonlításban egyik esetben sem találtunk szignifikáns eltérést.

4.7.2. Proteomikai eredmények

Az mRNS-szinten vizsgált molekulák protein-szintű mennyiségi meghatározásához un. jelölés nélküli SRM alapú kvantitatív fehérje analízist végeztünk. Az ErbB2 és tenascin-C kivételével mindegyik gén fehérjéjét meg tudtuk határozni. Az összesített eredményeket a 14. táblázat mutatja.

Peri-GBM ill. peri-Met korrelációban 11 ECM fehérje mennyisége volt emelkedett GBM esetében, amiből 5 mutatott az mRNS értékekkel megegyező irányú változást: N-kadherin-2, CD168, integrin beta-1, MMP-9, neurokán. A CD168 emelkedés szignifikánsnak bizonyult (95% CI: 325,9-1109,1) csakúgy, mint gén szinten. A metasztázis körül 6 fehérje szintjének emelkedését detektáltuk, amiből 3 volt az mRNS változással megegyező: integrin alfa-1, tenascin-R és verzikan. A fibronectin-szint növekedés peri-Met-ben szintén szignifikánsnak bizonyult (95% CI: [-642,5]-[-10,5]).



14. táblázat. Az inváziós panel molekuláinak fehérje expressziós szintjei glioblasztóma melletti agyállomány (peri-GBM) és áttéti daganat melletti agyállomány (peri-Met) és nem tumoros betegből származó (norm) agyszövetmintákban

Nem tumoros agyszövethez viszonyítva peri-GBM mintákban 13 fehérje szintje volt nagyobb, amiből 10 a génexpressziókkal megegyező változást mutatott: N-kadherin-2, kollagén alfa-1, ErbB1, fibronectin, CD 168, integrin alfa-1, alfa-3, beta-1, laminin beta-1, MMP-9. Mindössze 4 fehérje koncentrációja volt magasabb Norm szövetben, ebből 2 mutatott konkordanciát: tenascin-R, versikan. Szignifikáns eltérést nem detektáltunk.

Peri-Met és Norm összehasonlításban 8 fehérje szintje emelkedett meg a peritumorális szövetben, 7 esetben konkordanciával: kollagén alfa-1, ErbB1, integrin alfa-1, alfa-3, alfa-7, beta-1, versikan. A peri-GBM - Peri-Met korrelációhoz hasonlóan a fibronectin-szint emelkedés itt is szignifikáns volt annak ellenére, hogy gén szinten ugyanúgy csökkenést detektáltunk. Peri-Met-ben nem tumoros mintákhoz képest csökkent koncentrációt mértünk 9 fehérje esetében, ebből 4 esetben volt a csökkenés az mRNS változással megegyező irányú: N kadherin-2, MMP-2, neurokan, tenascin-R. Ez utóbbi esetben sem találtunk szignifikáns eltérést.

4.8. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblasztómában

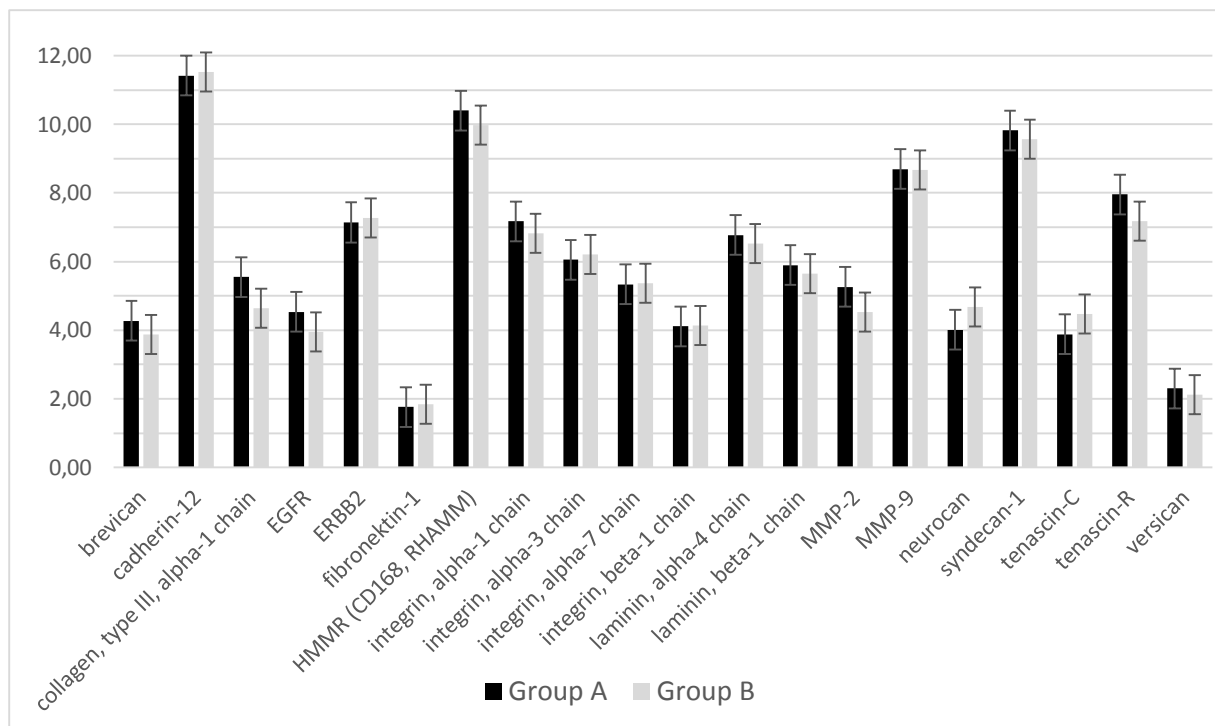
4.8.1. A betegek klinikai adatainak eredményei

A GBM mintákat két csoportba osztottuk a teljes túlélés alapján; 23 hónapos túlélést tekintettük szelekciós tényezőnek. A 23 hónap vagy annál rövidebb teljes túléléssel rendelkező betegekből származó mintákból képeztük az „A” csoportot, míg a „B” csoportba a 23 hónapnál nagyobb teljes túlélést mutató betegek kerültek (A csoport 12 fő, B csoport 14 fő).

Az invázióban szerepet játszó molekulák meghatározására kiválasztott mintákat adó betegek átlagos progresszió mentes túlélése (PFS) az A csoportban $8,0 \pm 7,0$ hónap, a B csoportban $14,4 \pm 8,3$ hónap volt. Az átlagos teljes túlélés (OS) az A csoportban $13,4 \pm 8,3$ hónapnak, míg a B csoportban $35,2 \pm 13,6$ hónapnak adódott. A két csoport átlagos progresszió mentes és teljes túlélése szignifikánsan különbözik egymástól (PFS: $p = 0,04$; OS: $p < 0,001$). A tumorok lebenyi lokalizációja és a daganat oldaliságában nem mutatkozott szignifikáns különbség a két eltérő túlélési csoportban ($p = 0,52$, ill. $p = 0,75$). A daganatok legnagyobb átmérője átlagosan $49,3 \pm 20,8$ mm volt az A csoportban, $43,5 \pm 17,7$ mm a B csoportban, a két csoportban a daganatok átlagos mérete nem különbözött egymástól szignifikánsan ($p = 0,42$). A két csoportban a kiújulás miatti reoperációk aránya (7/12 vs. 12/14) sem különbözik szignifikánsan egymástól ($p = 0,27$). Elmondható tehát, hogy a túléléseket leszámítva a betegek klinikai paraméterei hozzávetőlegesen azonosak, a két csoport homogenitása nem különbözik egymástól szignifikánsan.

4.8.2. Az inváziós molekulák RNS expressziós mintázata

Az egyes gének expresszióját egyedileg vizsgálva a két csoport adatai között szignifikáns különbséget nem találtunk (16. ábra). A 20 ECM alkotó expresszióját együttesen vizsgálva azonban az egyes csoportokra jellemző inváziós mintázat, azaz inváziós spektrum hozható létre, melynek statisztikai osztályozó algoritmusok elemzésével specifikus és szignifikáns eltérés igazolható a különböző túlélést mutató betegcsoportok között.



16. ábra. Az inváziós panel molekuláinak mRNA expressziós értékei különböző túlélést mutató GBM mintákban. Group A: átlagos teljes túlélés < 23 hónap; Group B: átlagos teljes túlélés > 23 hónap

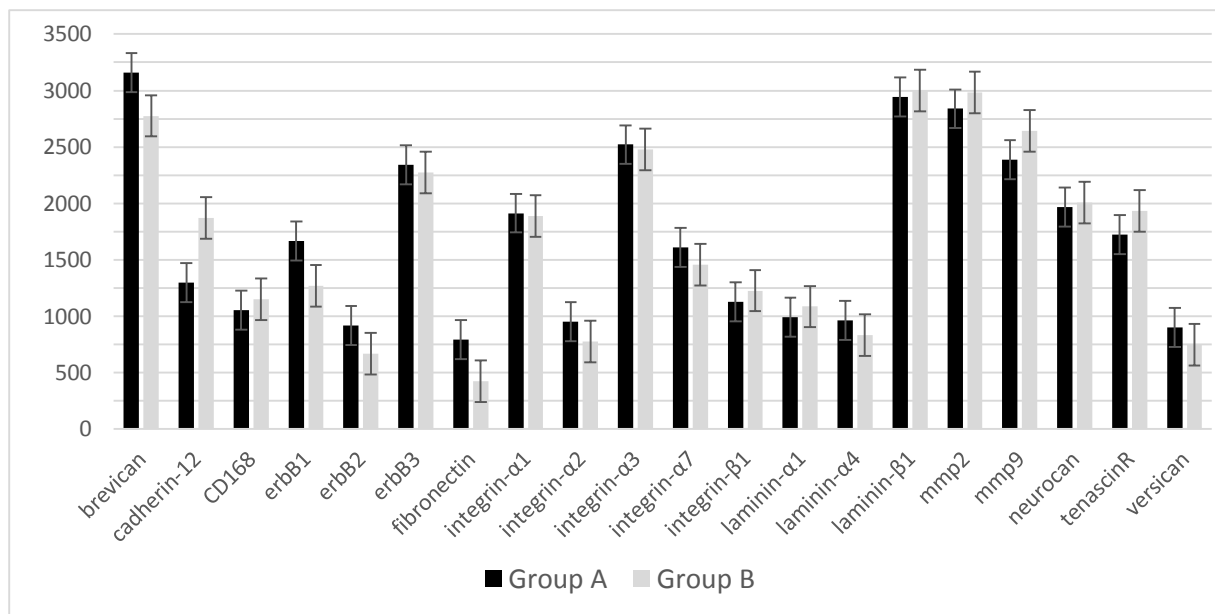
A csoport-összehasonlítást végző tesztek mellett bizonyos molekulák kulcsszerepét is meghatározták, melyek együttes expresszióváltozása a szignifikáns különbséghez nélkülözhetetlenek. A két különböző betegcsoportban a brevikan és az integrin- β 1 expressziós szintje tűnik jelentősnek a tumorok invazivitása és a várható túlélés alakulása szempontjából. Az elemző program a minták 85,2%-át azonosította helyesen, a módszer szenzitivitása 0,852; pozitív prediktív értéke 0,858 volt (15. táblázat). Az elemzések során tehát egyértelműen megállapítható, hogy a molekulák inváziós spektruma és a várható túlélés jól igazolható összefüggést mutat.

	Helyesen azonosított minták		Szenzitivitás	ROC analízis érték	Pozitív prediktív érték
	No.	%			
A csoport	9/14	64,2%	0,750	0,775	0,900
B csoport	14/15	93,3%	0,933	0,775	0,824
Összesítve	23/25	85,0%	0,852	0,775	0,858

15. táblázat. Az inváziós panel mRNS expressziós eredményeinek statisztikai osztályozóval történő elemzése után a jobb és rosszabb prognózisú csoportok elkülönülése glioblasztómában

4.8.3. Protein expressziós eredmények

A proteinszintű elemzések során az A és B csoportok között a molekulákat egyenként vizsgálva szignifikáns különbség nem igazolható (17. ábra). A fehérje szintű expressziós értékekből összeálló inváziós spektrum az egyedi adatokkal szemben azonban jól használható, hiszen az expressziós mintázat alapján az esetek 85,7%-ában a mintát helyesen becsülte meg túlélés szempontjából (szenzitivitás: 0,857, pozitív prediktív érték: 0,893). Kiemelendő, hogy a magasabb túlélési csoportba tartozó minták mindegyikét helyesen becsülte az algoritmus (16. táblázat). A brevikán, kadherin-12, integrin- α 3, valamint laminin- α 4 és β 1 fehérjék bizonyultak kulcsmolekulának az osztályozás szempontjából.



17. ábra. Az inváziós panel molekuláinak protein expressziós értékei különböző túlélést mutató GBM mintákban. Group A: átlagos teljes túlélés < 23 hónap; Group B: átlagos teljes túlélés > 23 hónap

	Helyesen azonosított minták		Szenzitivitás	ROC analízis érték	Pozitív prediktív érték
	No.	%			
A csoport	6/8	0,75%	0,75	0,875	1
B csoport	6/6	100%	1	0,875	0,75
Összesítve	12/14	85,7%	0,857	0,875	0,89

16. táblázat. Az inváziós panel protein expressziós eredményeinek statisztikai osztályozóval történő elemzése után a jobb és rosszabb prognózisú csoportok elkülönülése glioblasztómában.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A Neuro-onkológiai Labor kutatási hatékonysága

A DE Idegsebészeti Klinikán 2005-ben létrehozott Laborral sikerült megteremteni a klinikai beteganyag tudományos feldolgozához szükséges szövet- és adatgyűjtemény feltételeit, és az e célra kialakított Idegsebészeti Agydaganat- és Szövetbank messzemenően beváltotta a hozzá fűzött reményeket. Az elmúlt 12 évben összesen 1121 műtét során 68 különböző szövettani entitásból vettünk intraoperatív gyorsfagyasztott szövetmintát, majd a darabolt tárolás eredményeképpen végül 6324 minta katalogizált tárolása valósult meg. A későbbi kutatási támogatások (TÁMOP, NAP) segítségével a Labor kapacitásának növelésével teljes vér és szérumminta gyűjtése is megkezdődhetett, melynek köszönhetően jelenleg 307 betegből rendelkezünk mélyfagyasztott aliquotba rendezett mintákkal.

Különösen nagy értéke az Agydaganatbanknak a nagyszámú, funkcionális idegsebészeti műtétből vagy térfoglaló folyamat esetén elvégzett dekompreszióból származó nem-tumoros agyszövetminta, mely minden agydaganatkutatásban végzett vizsgálathoz nélkülözhetetlen referenciaanyagként szolgál. E tekintetben az Agydaganatbankunk nemzetközi szinten is kuriózumnak tekinthető és a kollaborációs vonzereje is kiemelkedő.

A jelen disszertáció alapját képező összes közlemény saját kutatások eredményeire épült, de a Tumorbanknak köszönhetően igen kiterjedt kollaborációs hálózatot hoztunk létre, melynek során 11 hazai, 2 kanadai és 1 németországi kutatólaborral alakítottunk ki nemzetközi közleményekben mérhető aktív tudományos kapcsolatot.

Az Agydaganat- és Szövetbankban rejlő kutatási potenciál

A Tumorbankban rendelkezésre álló szövetminták tudományos igényű feldolgozása számos további klinikai relevanciával bíró témakört hordoz magában. A három fő szövetminta típus (tumor, szérum, teljes vér) ugyanis különböző módon nyújtva információt az intrakraniális daganatról a betegellátás különböző megközelítési módját is előrevetíti:

1. A jelenlegi tumorminta-kutatás a már radiológiai képalkotó módszerekkel diagnosztizált, kialakult intrakraniális szövetszaporulat idegsebészeti műtétén átesett betegek pontos diagnózisát és a személyre szabott onkoterápiájának megvalósulását célozza.

2. A szérum-minták vizsgálatával az exosomák kutatása valósulhat meg. Ezek a tumorból származó különböző molekulákat (proteinek, miRNS, stb.) tartalmazó mikrovezikulumok műtéti beavatkozás nélkül is lehetőséget adhatnak a jövőben a szövettani típus, a proliferációs hajlam, vagy éppen az inváziós aktivitás meghatározására. Ezáltal a radiológiai és laborvizsgálatok együttes elemzésétől az onkoterápiás stratégia megállapítása is lehetségessé válhat. Különösen hasznos lehet ez elokvens régiók kisméretű infiltratív tumorai esetében, vagy olyan szövettani entitások eseteiben, amikor a tumorelimináció a daganat sugár- és kemoszenzitivitásának köszönhetően műtéti rizikó nélkül megoldható. Az első kategóriába tartozik a gliómák nagy csoportja, míg a másodikba az intracerebrális limfómák, germinómák valamint a stereotaxiás sugársebészeti beavatkozással jól kezelhető áttéti daganatok nagy esetszámú csoportja tartozik.
3. A teljes vér vizsgálatával a genom feltérképezése, az onko- és szupresszorgének meghatározása, a tumor kialakulásának előrejelezhető valószínűsége határozható meg, így az ezirányú kutatások már a prevenció, a korai diagnózis, a korai, jóval effektívebb onkoterápia lehetőségét hordozzák magukban.

5.2. A jelenlegi onkoterápia hatékonyságának meghatározása glioblasztóma esetében saját beteganyagon

A DE KK Idegsebészeti Klinikán 2002 és 2012 között operált 104 primer glioblasztómás beteg kórlefolyását elemeztük a különböző kezelési módusok hatékonyságának és a klinikai paraméterek prognosztikai szerepének megítélésére. A klinikai paraméterekkel kapcsolatos megfigyeléseink alapján elmondhatjuk, hogy a jó preoperatív Karnofsky pontszámú, jó általános állapotú betegek esetében a beteg neme, kora, a daganat oldalisága, mérete és lokalizációja önálló prognosztikai faktor szerepét igazolni nem tudtuk. A műtét radikalitása a konkuráló kemo-irradiációban részesült betegek (RT+TMZ) csoportjában kedvezően befolyásolta a teljes túlélést, de a többi csoportban nem igazolódott statisztikai összefüggés a műtét típusa és a túlélés között. Mivel a posztoperatív kezelést a KPS pontszám és a neurológiai status egyértelműen befolyásolja, megállapítható, hogy a jó posztoperatív státusz megőrzése a túlélés szempontjából nagyobb jelentőségű, mint a műtéti reszekció kiterjedtsége. Ezért a korábbi ajánlásokkal ellentétben a magas műtéti rizikót jelentő

tumorlokalizáció esetében csak biztonságosan elvégezhető mértékű parciális reszekció javasolható.

Kiemelendő, hogy a vizsgált betegpopulációban sem a csak radioterápiát kapott betegek esetében, sem a kemoterápiával kombinált kezelés esetében a tumorméret önmagában nem volt statisztikailag igazolható befolyással a túlélésre. Eredményeink azt támasztják alá, hogy a daganatellenes kezelést képviselő irradiáció, ill. kemoterápia a tumormérettől függetlenül fejti ki hatását. Ugyanezt az eredményt kapták Back MF és mtsai is [96]. Általánosan elfogadott irodalmi adat azonban, hogy idős korban viszont (átlag 73 +/- 5 év) a 4 cm-nél nagyobb tumor méret a rossz prognosztikai tényezők közé tartozik, amelyek szignifikánsan csökkentik az átlagos túlélési időt [97]. Ehhez hasonlóan Donato V. és mtsai szerint a glioblasztómás betegek túlélésének kimenetelét több egymástól független tényező együttesen, összetett módon határozza meg, melyek közül a 4 cm-nél nagyobb tumor méret rossz prognosztikai markernek számít [98].

A különböző kezelési metódusok effektivitásával kapcsolatban saját tapasztalataink szerint a palliatív sugárkezelésnek a progressziómentes túlélést szignifikánsan befolyásoló hatása nem igazolható sőt, a tüneti terápiához képest a teljes túlélést is csak kis mértékben hosszabbította meg. Mivel a pRT által nyújtott túlélésbeli hatás nagyrészt a progresszió utáni rossz neurológiai állapotra vonatkozik, effektivitása és indikációja erősen kétséges.

A teljes sugárkezelést kapott betegek (RT) túlélése szignifikánsan hosszabbnak bizonyult a BSC-hez és a pRT-hoz képest, mint ahogy a RT+TMZ-ban részesülő betegek teljes túlélése szignifikánsan hosszabbnak bizonyult a csak sugárkezelésben részesülő betegekéhez képest. A konkuráló kemo-irradiációs kezelést követő bevacizumab monoterápiában részesülő betegek túlélése szintén szignifikánsan hosszabb volt az összes többi csoporthoz képest, de ha közelebbről megvizsgáljuk a konkuráló kezelésben részesült betegek adataihoz képest elért eredményeket, a különbség már nem lesz statisztikailag definitív. Ugyanis a RT+TMZ és a RT+TMZ+BC csoport betegeinek a progresszióig eltelt ideje 8,4 hónap *versus* 11,8 hónap, melyek között a fennálló 3,4 hónap különbség a két csoport OS-e közötti 6,9 hónapot 3,5 hónapra csökkentí. Ez a különbség a két terápia között azonban nem bizonyul szignifikánsnak. A két csoport progresszióig eltelt idejében észlelt jelentős különbség magyarázata valószínűleg abban rejlik, hogy bevacizumab kezelésben csak a jó neurológiai állapotú, és progresszió ellenére legalább KPS 70 ponttal rendelkező betegek részesülhetnek, ami tulajdonképpen egy előzetes szelekciót eredményez a lassúbb lefolyású, kemoterápiára jobban reagáló betegek javára. Összességében tehát annak ellenére, hogy a bevacizumab kezelésben részesült csoport

esetében az OS egyértelműen hosszabb, mint a bevacizumab kezelést nem kapott betegek esetében, a különbséget statisztikailag igazolni nem lehetett.

Azonos bázisterápiában részesülő betegek túlélési adatainak elemzése

Az általunk vizsgált glioblasztómás betegek közül összesen 60 beteg részesült a műtéti ellátást követően konkuráló kemo-irradiációs kezelésben. Minden beteg posztoperatív Karnofsky pontja legalább 70 volt, minden beteg 60 Gy FBRT-ben részesült és minden betegnél addig folytattuk a TMZ kezelést, amíg vagy a neurológiai állapota vagy a koponya MRI nem mutatott egyértelmű rosszabbodást. Elmondhatjuk tehát, hogy a „bázisterápia” minden beteg esetében azonos volt, az OS mégis igen nagy szórást mutatott (min. 4, max. 43 hónap). Ennek az igen nagy eltérésnek a magyarázatát keresve a betegeket két csoportra osztottuk: az első csoportba tartoztak azok, akiknek a túlélése 16 hónapnál rövidebb volt (átlag: $10,2 \pm 4,2$ hónap). A második csoportba a 16 hónapnál hosszabban túlélő betegeket soroltuk (átlag: $25,7 \pm 7,4$). E két csoport paramétereinek összehasonlításával próbáltunk a nagyfokú eltérésre klinikai szempontból magyarázatot találni és egyben klinikai prognosztikai faktort meghatározni. A 16 hónapos átlagos túlélési határvonalat a jelenlegi bázis-terápiának minősülő standard konkuráló kemo-irradiációban részesült betegek irodalmi adatok szerinti átlagos túlélési időtartama adta. A két csoport klinikai adatait a 17. táblázat tartalmazza.

	Eset-szám	Bevacizumab kezelésben részesült betegek	Reoperált betegek	OS (hónap)	PFS (hónap)	Nem (F/N)	Életkor (év)	Oldal (J/B)	Preop. KPS	Postop. KPS	Tumor- méret (cm)
1. csop.	28	7	7	10,2 $\pm 4,2$	4,5 $\pm 2,3$	15/13	52,0 $\pm 13,2$	16/12	75,4 $\pm 19,3$	77,5 $\pm 8,0$	4,3 $\pm 1,0$
2. csop.	32	18	15	25,7 $\pm 7,4$	13,4 $\pm 7,5$	19/13	54,3 $\pm 11,0$	11/21	78,4 $\pm 13,5$	78,4 $\pm 10,3$	4,1 $\pm 1,1$

A tumor lokalizációja	frontális	temporális	parietális	occipitális	többlebenyi
1. csop.	11	3	4	1	9
2. csop.	8	11	5	2	6

A sebészi beavatkozás típusa	biopszia	részleges eltávolítás	teljes eltávolítás
1. csop.	4	10	14
2. csop.	1	11	20

17. táblázat. A különböző átlagos túlélést mutató csoportok klinikai paramétereit. OS= teljes túlélés, PFS = progresszió mentes túlélés, F=férfi, N=nő, J=jobb, B=bal, KPS=Karnofsky Performance Score

A két csoport összehasonlításánál megállapítható, hogy a nemek aránya, a betegek kora, a tumor oldalisága, mérete, lokalizációja, a preoperatív és posztoperatív KPS nem különbözött jelentősen. A makroszkóposan teljes műtéti tumoreltávolítás aránya valamivel magasabb volt a hosszabb túlélést mutató csoportban, mint a hamarabb elhalálozottak között (62,5 % *versus* 50,0 %), de a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak ($p = 0,4754$). Egyértelműen szignifikáns különbség csak a szelekciós paraméterként meghatározott túlélési időtartamokban mutatkozott (PFS $4,53 \pm 5,29$ hónap *versus* $13,37 \pm 7,51$ hónap, $p < 0,0001$, OS $10,21 \pm 4,19$ *versus* $25,68 \pm 7,39$, $p < 0,0001$), ami a két csoportot elválasztó paraméter megfelelő szelekciós erősségét igazolta.

A túlélések elemzésénél megállapítható, hogy az azonos kiinduló neurológiai státus mellett azonos bázisterápiában részesülő, mégis igen nagy PFS és OS különbséget mutató csoportok klinikai paramétereinek elemzésénél a két csoport között statisztikailag szignifikánsnak mondható különbség egyetlen klinikai paraméter esetében sem igazolódott. Ez alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy eredményeink azt bizonyítják, hogy az azonos neurológiai státuszú és azonos bázisterápiában részesült betegek túlélését nem a vizsgált klinikai paraméterek, hanem a daganat sugár- és kemoszenzitivitása határozza meg.

5.3. Prediktív markerek meghatározása saját beteganyagon: az 1 p19q kodeláció klinikai relevanciája oligodendrogliómákban és oligoasztrocitómákban

Az oligodendroglióma a harmadik leggyakoribb gliális eredetű tumor, a gliómák 5-20%-át alkotják [3, 99, 100]. Európában az éves incidencia 0,2 eset 100.000 lakosra [101]. Megkülönböztetünk kizárólag oligodendrogliális komponensű daganatokat (oligodendroglióma), illetve asztrociter elemeket is tartalmazó tumorokat (oligoasztrocitóma) [101–103]. Az oligodendrogliómák prognózisa kedvezőbb, mint az asztrocita komponenst is tartalmazó daganatoké [99]. Az oligodendrogliómák a WHO klasszifikáció alapján *low grade* (II. grádus) és *high grade* (III. grádus) csoportokra oszthatók szövettani tulajdonságaik alapján [1, 101]. Mivel a gliómák jelentős része kevert tumor (oligo-asztrocitóma), ezért az asztrocitómák neuro-onkológiai kezelésének megtervezéséhez az oligodendrogliá-komponens prognózist befolyásoló szerepének ismerete feltétlenül szükséges. Irodalmi adatok szerint a DNS replikációt gátló onkoterápia hatékonyságát csökkentő repair-mechanizmusok enzimeit kódoló géneket érintő kromoszóma rendellenességek hozhatók leginkább összefüggésbe a prognózissal. A leggyakrabban észlelt kromoszómális rendellenesség oligodendrogliómákban

az 1p, illetve a 19q lókuszok elvesztése [104]. Az oligodendrogliómák 75%-ában kimutatható vagy az 1p, vagy a 19q deléció, míg az együttes deléció (kodeléció) az esetek 60-70%-ában van jelen [105, 106]. A II. grádusú tumorok kb. 80-90%-ban kimutatható az 1p/19q kodeléció [107, 108], amit kiegyensúlyozatlan transzlokáció $[t(1;19)(q10;p10)]$ okoz [109, 110]. Ehhez az eltéréshez mind II-es, mind III-as grádus esetén jobb kemoterápiás válasz készség [105, 111–113] és hosszabb PFS társul [111, 114]. A jelenség hátterében egyrészt a sejtek eltérő osztódási és apoptotikus képessége állhat [115], illetve több tanulmány szerint az 1p/19q-kodeléció jelenléte alacsony grádusú gliómákban a tumor alkilálószerre való érzékenysége jelzője [116]. Egyes felmérések alapján a kodeléció jelenléte a frontálisan daganatokban gyakrabban észlelhető, mint a temporalis lebenyben elhelyezkedő tumorok esetén [117]. A gyermekkori oligodendrogliómákban – főleg az első évtizedben – az 1p/19q kodeléció ritkábban fordul elő [118].

Jelen tanulmányunkban az eddig elvégzett vizsgálatokkal kapcsolatos klinikai tapasztalatokat gyűjtöttük össze. 2006. és 2008. között a DE KK Idegsebészeti Klinikán 28 oligodendroglioma komponenssel rendelkező gliomás beteg esetében történt 1p/19q-kodeléció-analízis, melynek eredményeit klinikai adatokkal vetettük össze. Emellett a különböző kezelési protokollokban részesült betegek adatainak elemzésével az 1p/19q-kodeléciónak a kemoterápiára érzékeny („responder”) betegcsoport meghatározásában betöltött prognosztikai alkalmazhatóságát teszteltük. Eredményeink alapján az oligodendroglioma komponensű gliómák vonatkozásában az alább részletezett következtetésekre jutottunk.

III-as grádusú daganatokban a kor előrehaladtával csökkent a kemoterápiára érzékeny, jobb prognózisú betegek aránya, ami az idősebb korban jelentkező tumorok agresszívabb jellege mellett szól.

Az 1p/19q-kodeléció a reszekabilitással pozitív korrelációt mutatott. Bár II-es grádusú daganatok esetében a műtét radikalitása nem befolyásolta jelentősen a recidívamentes túlélést, a III-as grádusú tumorok esetében azonban 1p/19q-kodeléció jelenlétében a recidívamentes túlélés szignifikánsan hosszabb volt teljesen reszekálható tumorok esetében a parciális tumoreltávolításhoz képest.

Az 1p/19q kodeléció előfordulási gyakorisága gliómákban asztrocita komponens esetén kisebb, mint oligodendrogliómákban. Ez a megfigyelés egybecseng az asztrocitómák kisebb kemoszenzitivitásával, így kevert komponensű daganatok esetén a sugárkezelés indikációja – különösen 1p/19q kodeléció nélküli esetekben – megerősíthető.

A recidívamentes túlélést befolyásolta a tumor lokalizációja: a szubdomináns féltekében valószínűleg nagyobb arányban lehetett teljes reszekciót végezni.

1p/19q-kodeláció kemoterápiára való érzékenységet prognosztizáló szerepe II-es grádusú eseteket tekintve saját beteganyagon is bizonyítható volt.

Végül, eredményeink alapján az 1p19q státusznak a kemoterápiára való érzékenységet jellemző szerepét tekintve az oligodendroglioma komponensű tumorok esetében az onkoterápia megválasztásában betöltött prediktív funkciója megerősítést nyert.

5.4. A temozolomid vizsgálata glioblasztómában

5.4.1. A temozolomid szérumbeli koncentrációjának meghatározása glioblasztómás betegen

Jelenleg az egyetlen rutinszerűen adott elsővonalbeli kemoterapeutikum a GBM terápiájában a TMZ, melynek glioblasztómás beteg vérmintáiban, humán agyszövetben vagy daganatszövetben elért lokális koncentrációjáról az irodalomban alig találhatók direkt mérésekből származó adatok. Ezek hiányában nem is szerepel ajánlás az orális alkiláló ágens bevitelének és a sugárkezelés kivitelezésének időbeni tervezésére, pedig a gyógyszer-penetrációt fokozó sugárhatás és a vérben elérhető maximális gyógyszerkoncentráció összehangolásától az onkoterápia hatékonyságának optimalizálása lenne várható. Az igen kis mennyiségű és igen gyorsan lebomló kemoterapeutikum komplex biológiai mintából (vérből) történő kimutatása azonban nem tekinthető könnyen elérhető rutinszerű módszernek, így érthető, hogy klinikai betegellátásból származó adatokat nem könnyű találni az irodalomban.

Az elmúlt két évtizedben, a kapilláris elektroforézis hatékony és sokoldalú szeparációs eszközzé vált magas felbontási képességének, továbbá annak köszönhetően, hogy képes igen kis mennyiséget detektálni még komplex (biológiai) mátrixokban is, de közismert előnyeinek ellenére sem volt eddig olyan tanulmány, amely a TMZ és annak lebomlási termékeinek CE-vel kivitelezett analízisééről számolt volna be. Jelen tanulmányban MEKC-t alkalmazva glioblasztómás betegek szérumának TMZ koncentrációját monitoroztuk egyszeri 400 mg-os *per os* dózis után. Vizsgálataink során igazolni tudtuk, hogy a MEKC technika UV spektrofotometriás detektálással jól alkalmazható a TMZ *in vivo* direkt meghatározására daganatos betegek szérumában. Méréseink alapján megállapítottuk, hogy sikerült glioblasztómás betegek vérében a TMZ és lebomlási termékeinek (MTIC és AIC) mennyiségét megfelelő pontossággal meghatározni.

Eredményeink alapján a radioterápiát a TMZ bevétele utáni 1-2 óra közötti intervallumban javasolt elvégezni. Tanulmányunk eredményeképpen a Debreceni Egyetemen a glioblasztómás betegek kezelése már ezzel az ajánlással kiegészített protokoll szerint zajlik.

5.4.2. A temozolomid intratumorális koncentrációjának direkt meghatározása humán glioblasztómában

A gyógyszerek intratumorális lokális koncentrációjának ismerete kulcsfontosságú lehet a gyógyszer hatékonyságának és akkumulációjának meghatározásához, hiszen ha össze lehetne hasonlítani direkt mérésekkel a különböző készítmények intratumorális csúcskoncentrációját, akkor a legmegfelelőbb ágens kiválasztása is kézenfekvő lenne.

A jelenlegi vizsgálatot egy olyan ritka lehetőség szülte, melynek során egy ismert glioblasztómás beteg a monoterápiás TMZ kezelés alatt állapotrosszabbodás miatt került klinikai felvételre, ahol első lépésben a tumor okozta térfoglaló hatás miatt dehidrációt célzó kezelés indult és a beteg a szokásos 400 mg TMZ adagját is bevette. Nem sokkal ezután azonban tudatzavara alakult ki és a térfoglaló hatás redukálása érdekében sürgős műtét történt. Ennek során a tumor reszekálásával sikerült a beteg neurológiai állapotát stabilizálni, és a szövettani vizsgálatra szánt szövetmintákból gyógyszer szint meghatározást is tudtunk végezni.

Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a MEKC hasznosnak bizonyult agydaganatminták mérésének esetében is. A jelen kutatásban viszonylag kevés előkészületi folyamatot alkalmaztunk és csupán 0,8 g-os minta (tumor) elegendő volt az elődúsításhoz és analízishez. Az új analitikai módszerként alkalmazott szövetminta-liofilizálás, majd homogenizált oldatba vitele megbízható módszernek bizonyult és megfelelő érzékenységű méréseket tett lehetővé.

A tumor minták eredményeiből összefoglalható, hogy a TMZ képes áthatolni a vér-agy gáton, de a csúcskoncentráció az analizált mintákban nem magasabb, mint 0,12 µg/g. Ez az általunk *in vivo* mért TMZ koncentráció érték kisebb, mint más kutatók által megállapított értékek. Egy intracerebrális mikrodialízis tanulmányban a TMZ csúcskoncentrációja az agy interstitiumában 0,6 µg/mL körülinek mutatkozott [25, 119]. Egy prediktív farmakokinetikai modell alapján pedig a jósolt TMZ csúcskoncentráció 1,8-3,7 µg/mL közötti értéket ér el az agyban [120]. A különbségek elsődleges oka a mintavétel helyéül szolgáló fiziológiai kompartmentek különbségei lehetnek [119], de az általunk végzett direkt gyógyszer szint meghatározás módszertani megbízhatóság szempontjából elsőbbséget élvezve felülírhatja az eddig közölt eredményeket.

Összefoglalva, tanulmányunkban először az irodalomban sikerült a TMZ lokális intratumorális koncentrációt humán glioblasztómában meghatározni. Ennek során kidolgoztuk a szilárd halmazállapotú tumorállomány CE-vel történő meghatározásának technikáját, mely az irodalomban szintén novumnak számít. Az általunk detektált érték a korábbi közlésekben található indirekt számított értékeknél egyértelműen alacsonyabbnak bizonyult. A jelenlegi onkoterápia során elérhető intratumorális gyógyszer szint további, magasabb lokális koncentráció biztosítására alkalmas készítmények iránti igényt alapoz meg.

5.5. Az EGFR és az integrinek kölcsönhatásának szerepe asztrocitómákban

5.5.1. Az *ErbB1 (EGFR)* és az *integrin-β1* közti molekuláris interakció vizsgálata asztrocitómákban

A folyamatosan bővülő terápiás eszközkészlet ellenére még ma is kedvezőtlen a magas grádusú asztrocitómák prognózisa. A daganatsejtek lokális inváziójuk révén lehetetlenné teszik a sebészi eltávolítást, így peritumorális recidíva jelentkezik. Adatok támasztják alá pl. az integrin (α V β 1 heterodimer) szerepét az agyi daganatsejtek migrációjában, expressziós szintjük összefügg a daganat típusával és grádusával [121]. A „sejtadhezió-mediált terápia rezisztencia”, mint fogalom megalapozza azt a felvetést, hogy a daganatsejtek menekülési útvonalai a sejt-sejt és sejt-ECM kapcsolatokon is alapulnak [122]. Már felvetették az ErbB1 és integrin- β 1 molekulák *downstream* szignalizációjának inhibíciója és a sugárkezelés közötti szinergizmus lehetőségét is [123–125]. A GBM nemrégiben vált az ErbB1 kis molekulású TKI-ok egyik lehetséges célpontjává [126–128], az integrin- α V β 3 inhibíciójára alkalmas cilengitide pedig el is érte a klinikai fázist [129, 130].

A klinikai gyakorlatban is várható előnyös alkalmazhatóságra való tekintettel egy olyan módszert fejlesztettünk ki, amely intraoperatív frissen fagyasztott asztrocitóma mintákban az ErbB1 és integrin- β 1 molekulák közötti kölcsönhatás mértékét képes kvantifikálni. A II-es és IV-es grádusú daganatok csoportjait összehasonlítva, a celluláris modelleken történt változásokhoz hasonlóan, a megnövekedett integrin- β 1 expresszió, illetve a fokozott ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociáció sokkal relevánsabbnak bizonyult a grádus és a prognózis megjósolása szempontjából, mint a magasabb ErbB1 expressziós szint. A túlélési idő és a PFS ellentétes viszonyban volt az *in situ* mért integrin- β 1 expresszióval és ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociációkkal. Az utóbbi a komplex hisztopatológiai grádus meghatározással

meggyező hatékonysággal klasszifikálta a tumor grádusát és egyedüli meghatározója volt a prognózisnak. Összegezve, eredményeink megerősítik az EGFR és az integrin-mediált invázió-ellenes kemoterapeutikumok kifejlesztésének és alkalmazásának igényét.

5.5.2. Az EGFR mutáció szerepének vizsgálata rekurrens glioblasztómában

Az EGFR gén amplifikált vagy az EGFR fehérje fokozottan expresszált a glioblasztómák több mint 60%-ában. Az EGFR gén mutációja az EGFR fehérje fokozott expresszióját mutató daganatok 50-70 %-ában megtalálható és a mutáns receptor, az EGFRvIII ligand-független kináz aktivitással rendelkezik [131].

A legújabb kutatások nagy hangsúlyt fektetnek az EGFR tirozin-kinázokra. 2004-ben két egymástól független tanulmány talált összefüggést az EGFR TK doménjében megtörtént mutáció és NSCLC-k gefitinib érzékenysége között [45, 46]. Ezek az EGFR kináz mutációk az EGFR ligand-függő kináz aktivitását segítették elő, egyidejűleg pedig növelték az érzékenységet a TKI-ok iránt. A TKI gyógyszerek (gefinitib, erlotinib) kompetícióba lépnek az ATP-vel a receptor kináz doménjéhez való kötődés során, ezáltal blokkolják a receptor aktivációt. Nem véletlen, hogy rekurrens glioblasztómás betegek esetében is felmerült már TKI alkalmazása, melyet napjainkban is számos kutatócsoport vizsgál. Jelen tanulmányban onkoterápia után kiújult GBM műtéti ellátásából származó szövetmintákon végeztünk EGFR gén amplifikáció meghatározást és mutáció-analízist.

A tanulmányunkban az EGFR fehérje fokozott expresszióját 65%-ban mutattuk ki. Az EGFR fehérje fokozott expressziójának hátterében 54%-ban az EGFR gén amplifikációja, 23%-ban pedig a nagyfokú poliszómia állt. A mutáció-analízis során azonban nem találtunk mutációt az EGFR gén TK doménjében. Az eredmények azt mutatják, hogy míg az EGFR fehérje fokozott expressziója és a gén amplifikáció jelen lehet a kemoterápia után, az EGFR gén TK doménjét érintő mutációk azonban nem jellemzőek a rekurrens glioblasztómára.

Eredményeink azt igazolták, hogy a rekurrens glioblasztómák nem rendelkeznek a kináz domén mutációjával, amely a glioblasztómák kezelésére alkalmazható TKI várható szerény hatékonyságára utal. Az EGFRvIII mellett, számos olyan mutáció lehet még, amely a *downstream* jelátviteli útvonal molekuláira hat és szerepet játszik ebben a folyamatban, különös tekintettel a k-ras-ra. Ellentétben azonban a nem kissejtes tüdőrákkal és a kolorektális karcinómával, a k-ras mutációja különösen ritka GBM-ák esetében. Így a recidív glioblasztómák optimális terápiájának meghatározására más jelátviteli útvonalak vizsgálata is szükséges lesz.

5.6. Agyi áttéti daganat és gliómák invazivitásának összehasonlítása

Általános megállapítás az onkológiában, hogy a tumor-eltávolítás radikalitása meghatározza az onkoterápia hatékonyságát. Ezt azonban a daganatok környezeti inváziója megghiúsíthatja, ahogyan az asztrocitómák esetében is előfordul. A peritumorális infiltrációt nemcsak a malignus gliómákban, hanem az alacsony grádusú tumorokban, így a II. grádusú asztrocitómákban is megfigyelték [132, 133]. Ezzel szemben a NSCLC agyi metasztázisai csak mérsékelten invazívak, így a radikális eltávolításuk általában rutin idegsebészeti beavatkozásnak számít [134–136]. Tanulmányunk célja elsősorban a különböző eredetű agytumorer invázióval összefüggésbe hozható molekulái expressziós mintázatának meghatározása és összehasonlítása volt. Másodsorban pedig azonosítani kívántuk azokat a molekulákat, amelyek elsődlegesen felelősek a II-es grádusú asztrocitómák peritumorális invazivitásáért. Mivel a tumorinvázió nagyban függ a meglehetősen nagyszámú ECM komponens és a tumorsejtek közötti interakcióktól, megvizsgáltuk egy gondosan összeválogatott 96 tagú ECM-alkotó csoport molekuláit, melyekről korábban már igazolódott, hogy aktívan részt vesznek a peritumorális infiltrációban. Az előzetes mérések során ezekből a molekulákból célzott vizsgálatokkal az intrakraniális daganatokra jellemző molekulák körét, az un. *inváziós panelt* határoztuk meg, és további mRNS expressziós méréseinkhez a különböző daganatok összehasonlításakor már ennek a panelnek a tagjait vizsgáltuk.

5.6.1. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztázisában és glioblasztómában

A tüdőkarcinóma agyi áttétei és a GBM összehasonlításakor összesen 30 ECM-komponens génexpresszióját határoztuk meg, hogy az eltérő invazivitás molekuláris hátteréhez közelebb kerüljünk. 21 ECM komponens, hét proteáz, a HA membrán-receptor (CD44) és a CD168 esetében végeztünk kvantitatív RT-PCR-t. Az mRNS analízis eredményei alapján a fentiek közül hét molekula (agrin, neurokán, szindekán, verzikán, MMP-2 MMP-9 és a HA) immunhisztokémiai festődését is vizsgáltuk.

Korábbi tanulmányok pozitív korrelációt írtak le a glióma inváziós készsége és a brevikan [137, 138], a fibronektin [139, 140] a laminin [139, 141] a szindekán [142], a tenascin-C [143, 144], a verzikán [145], az MMP-9 [146, 147], a HA [148] és a CD44 [149–151] expressziója között. Saját méréseink az irodalomban közölt eredményeket részben megerősítették, részben kiegészítették, amennyiben jelentős különbséget észleltünk a normál

agy és a GBM között a fibronectin, laminin β -1, perlekán, szindekán-1, -4, tenascin-C, -R, CD44, CD168, HAS-1, -2, és MMP-2 és -9 mRNS profilja tekintetében.

Nincs kielégítő adat az irodalomban asztrocitómák esetében az aggregánról, matrilinról, perlekánról, neuroglükán-C-ről, neurokánról, CD168-ról vagy a kondroitinázról. Megfigyelésünk szerint azonban a CD-168 és a perlekán mRNS expressziója szignifikánsan magasabb GBM-ben a normál agyszövethez képest, míg a többi tekintetében nem volt nyilvánvaló különbség a kettő között.

ECM komponenseket és invázióval összefüggő molekulákat vizsgálták már NSCLC esetében is. A bronchialis adenokarcinómában a HA [152], fibronectin [153, 154], laminin [155, 156], verzikán [157], MMP-9 [146] és a CD44 [158] szignifikánsan magasabb expresszióját észlelték, míg a perlekán, tenascin-C és a szindekán nem korrelált a tumornövekedéssel [153, 159, 160]. Nincs olyan adat sem, mely egyértelmű összefüggést mutatna az agrin, brevikán, matrilin, neuroglükán-C, neurokán, CD168, kondroitináz, HAS és a tüdő eredetű adenokarcinóma viselkedése között. Saját méréseink során összehasonlítva az intracerebrális tüdő adenokarcinóma metasztázisokat a normál agyszövettel, a vizsgált 30 molekula közül 18 esetében jelentős különbségeket észleltünk. Néhány molekula az eredeti szövetre jellemző (pl. a brevikán, neurokán, a neuroglükán-C az agyszövetmintákban), míg mások valószínűleg a peritumorális invázióban játszanak fontos szerepet (fibronectin, szindekán-1, 4, CD-168 és MMP-9). Az agrin, laminin β -1, β -2, γ -1 és a perlekán intracerebrális tüdő adenokarcinóma metasztázisban megnövekedett expressziójának magyarázatához még további kutatásokra van szükség.

Eredményeink szerint 11 molekula mRNS expressziója szignifikánsan különbözött a GBM és az adenokarcinóma metasztázis között. Mivel a brevikán, matrilin-2, neurokán, neuroglükán-C és a tenascin-R magasabb mRNS expressziót mutatott mind a normál agyszövetben, mind pedig a GBM-ban a metasztatikus tumorokhoz viszonyítva, ezeket a molekulákat a gliaszövetre specifikus molekuláknak tekinthetjük. Másrészt a tenascin-C, CD44, HAS-1 és a MMP-2 mRNS expressziója a metasztázishoz hasonlítva csak a GBM-ban volt emelkedett. Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy az előbbi, GBM-ben és normál agyszövetben egyaránt magasabb szintet mutató molekulák a primer agydaganat és a peritumorális agyállomány nagyfokú hasonlóságát eredményezik, így a GBM tumorsejtjei "otthonosan érezve" magukat a környező agyállományban, azt mélyen infiltrálni képesek. A többi szövetmintához képest a GBM-ben észlelt magasabb expressziót mutató molekulák pedig valószínűleg a tumor inváziójához szükséges és azt előmozdító komponensként szerepelnek.

Az mRNS expresszió és az immunhisztokémiai eredmények összehasonlítása

A vizsgált szövetminta-csoportok immunfestődési intenzitásában meglévő különbségek jól korreláltak a verzikán, agrin, szindekán és a MMP-2 mRNS-expressziójában észlelt eltérésekkel. Az immunhisztokémiai analízis során az agrin, a szindekán és a MMP-9 predominánsnak bizonyult a hörgő eredetű adenokarcinómában, míg a MMP-2, a neurokán és a HA a legerősebb immunfestődést a GBM-ban mutatta.

Az MMP-9 a legerősebb immunfestődési intenzitást a tüdő adenokarcinóma metasztázisaiban mutatta, de a legerősebb mRNS expressziót a GBM csoportban mértük. Bár a legmagasabb neurokán mRNS-expressziót normál agyszövetben találtuk, de az immunhisztokémiai reakció a tumorokban mutatott kissé emelkedett festődési intenzitást. Ezek az eltérések valószínűleg poszt-transzkripciós eseményekhez köthetők és pontos tisztázásukhoz további vizsgálatok szükségesek.

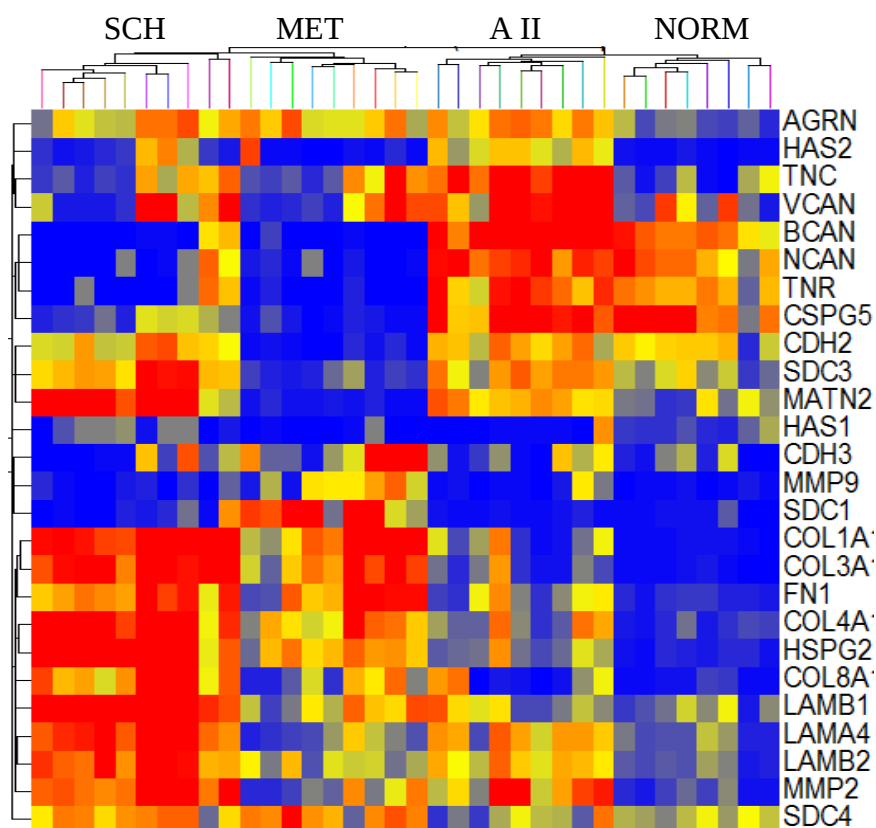
A HA leginkább GBM-ban volt jelen. Mivel receptorának, a CD44-nek ugyancsak magasabb mRNS expresszióját mértük, általános szerepe az invázió folyamatában megerősíthető.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a 30 invázióval összefüggő molekula mRNS expressziójának GBM-ben, normál agyszövetben és intracerebrális adenokarcinóma metasztázisban történő összehasonlításával sikerült néhány olyan molekulát azonosítani, melyek valószínűleg részt vesznek a GBM kiemelkedően magas inváziós aktivitásában. Vizsgálataink szerint a tenascin-C, CD44, és MMP-2 látszanak a leginkább érintettnek a GBM peritumorális infiltrációjában, de a fibronectin és a szindekánok korábbi közleményekben felvetett pozitív szerepét a különböző infiltrációs aktivitás tekintetében nem tudtuk megerősíteni. Az eddig közölt adatokhoz további új eredményként hozzájárulva a brevikán, neurokán, neuroglükán-C és a matrilin-2 glioblasztómák invazívitásában betöltött lehetséges szerepét tudtuk igazolni.

5.6.2. Az inváziós panel vizsgálata tüdőrák agyi metasztázisában, alacsony grádusú asztrocitómában és schwannomában

Az inváziós panel génexpresszióját infiltratív „szemibenignus” II-es grádusú asztrocitóma, non-infiltratív és benignus schwannoma és a non-infiltratív, de malignus NSCLC agyi metasztázisából származó szövetmintákon vizsgáltuk. A 26 tagú inváziós panel mRNS expressziójának meghatározásával az egyes csoportokra jellemző expressziós mintázatot sikerült alkotni. Cluster analízis útján vizsgáltuk ezeknél a molekuláknál az expressziós

mintázatban bekövetkezett változások jellemző voltát (18. ábra). E statisztikai teszt által világosan kimutatható, hogy minden egyes szövetszoportnak megvan a maga jellegzetes inváziós molekula mintázata (*inváziós spektrum*), ami arra utal, hogy az inváziós panel molekuláinak az mRNS expressziós mintázata az illető tumorszövetre erősen jellemző. A brevikán, neurokán, neuroglikán, tenaszcin, verzikán és a MMP-2 a normal agyszövetre és a II-es grádusú asztrocitómára voltak jellemzőek, míg a schwannoma és az adenokarcinóma ECM-a döntően kollagéneket, fibronektint, szindekánokat, laminineket és kadherineket tartalmazott. Ezek a jellegzetes inváziós spektrumok jelentős mennyiségű kötőszövetes állományra utalnak a schwannomában és a metasztázisban, míg a gliómás szövetekben a saját jellemző GAG-ok és PG-k jelennek meg. A nagyfokú hasonlóság a II-es grádusú asztrocitóma és a normál agy között magyarázatul szolgál a gliómasejtek környező agyszövetbe történő kiterjedt migrációjára. Ugyanakkor a jelentős különbség az adenokarcinóma és a normál agy inváziós spektruma között segít megérteni a csökkent peritumorális infiltrációt a metasztázis esetében.



18. ábra. Hierarchikus klaszterezés komplett kapcsoltsági elemzéssel Pearson korrelációt alkalmazva az mRNS expressziós mintázat specificitásának tesztelésére 26 invázióval összefüggő extracelluláris molekula esetén normál agyszövetből (NORM), II-es grádusú asztrocitómából (A II), intracerebrális adenokarcinóma metasztázisból (MET) és schwannomából (SCH) származó mintáknál. A kék-sárga-piros színek a génexpresszió fokozódását jelzik.

A különböző csoportok között az egyes molekulák expressziójában észlelt szignifikáns eltéréseket elemezve négy molekula (brevikán, neurokán, tenascin-C, verzikán) szintje jellemzően magasabbnak bizonyult a II-es grádusú asztrocitómában, mint a többi szövettípusban, ami a gliómák peritumorális inváziójában játszott egyedi szerepüket támasztja alá. Az immunhisztokémiai eredmények ezt a megfigyelést megerősítették.

5.7. A jelenlegi onkoterápia hatása az inváziós panel molekuláinak expressziójára

A ma már rutinszerűen alkalmazott konkuráló kezelés sikere mellett is jelentkező gyakori terápia-rezisztencia alapján felmerült az igény a glioblasztómák minél szélesebb körű génexpressziós és fehérje változásainak feltérképezésére. Többek között a sejtmotilitást, a membránösszetételt, valamint az ECM felépítését, és olyan jellegű változásait vizsgálják, melyek hatással vannak a GBM sejtek infiltrációjára és ezáltal meghatározzák a kezelés hatékonyságát. Ezen változások mélyebb ismerete megismertetheti a jelenlegi protokoll korlátait és utat nyithat új célpontú terápiák megtervezéséhez. Jelenleg kevés ismerettel rendelkezünk a konkuráló kezelés okozta részletes molekuláris mechanizmust illetően, a kezelés infiltrációra gyakorolt hatása sem tisztázott, és az eddigi vizsgálatok sejtenyészeten, nem pedig emberi agyszöveten történtek. Felmerült tehát az igény a glioblasztómák konkuráló kezelése eredményességének molekuláris szintű vizsgálatára, hogy választ kapjunk arra a kérdésre, hogy a jelenlegi onkoterápia gén és fehérje szinten létrehoz-e változásokat a GBM sejtek infiltrációját befolyásoló molekulák expressziójában? Jelen kutatásunk során 19, peritumorális infiltrációban szerepet játszó ECM-komponens mRNS és protein szintű expresszióját határoztuk meg kezelés előtti és konkuráló kemoirradiáció után kiújult humán GBM mintákban.

Méréseink szerint a kombinált sugár- és kemoterápiát követően mindössze a MMP-9 mRNS expressziója és a brevikán fehérje szintje mutatott szignifikáns csökkenést. A többi vizsgált molekula esetében nem volt szignifikáns változás.

Mint mátrix-degradáló enzim, az MMP-9 szintje glioblasztómákban emelkedést mutat a normál agyszövethez képest. Trog D. és mtsai TMZ és besugárzás hatását vizsgálták GBM sejtvonalon és a kezelést túlélő sejtekben szignifikáns metalloproteináz emelkedést tapasztaltak, ami korrelált az agresszív, infiltratív tulajdonsággal [161]. A mi eredményünkben

a MMP-9 RNS szinten még csökkenést mutatott, fehérje szinten azonban ennek ellenkezője volt tapasztalható.

A brevikan fehérjeszintű csökkenése összevág Nakada M. és mtsai valamint Held-Feindt J. és mtsai eredményeivel, akik a glioblasztómában szintén összefüggést találtak a brevikan szint csökkenése és a sejtinvázió között [162, 163].

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a konkuráló kemoirradiáció nem hat lényegesen a GBM inváziós képességére. A jelenlegi onkoterápia mindkét fő elemének (irradiáció és TMZ) elsődleges támadáspontja a DNS-replikáció gátlása, és így anti-proliferatív hatással bírnak. Vizsgálataink azt mutatják, hogy emellett, a sejtosztódást gátló hatás mellett az alkalmazott kezelésnek invázió-gátló hatása nem igazolható, így a hatályos konkuráló kemoirradiációnak a recidív GBM peritumorális infiltrációját jelentősen mérsékelő hatása nem várható. Az invázióban szerepet játszó ECM komponensek közül jelen tanulmányban kiszűrt és szignifikáns eltérést mutató két molekula a célzott anti-inváziós kezelések kifejlesztéséhez lehetséges targetként szolgálhat.

5.8. A peritumorális agyállomány szerepe a tumorinvázióban

Ebben a tanulmányban az invázióval összefüggő ECM komponenseket és transzmembrán receptorokat vizsgáltunk primer (GBM) és szekunder (adenokarcinóma metasztázis) agydaganatok peritumorális területében és nem tumoros agyszövetben. Mindegyik elemzésre kerülő molekulát a releváns irodalom áttekintése és a hasonló területen végzett korábbi kutatásaink eredménye alapján választottunk ki [62, 64, 88, 164].

Vizsgálataink során az mRNS expressziós mintázat létrehozása és a fehérje szintek kvantifikálásának eredményeképpen több ECM alkotóelem és receptor is összefüggésbe hozható a peritumorális invázió mértékével. Egyes molekulák mRNS és fehérje szinten is azonos irányú változást mutattak, emellett néhány szignifikánsan eltért a különböző vizsgált szövettani csoportokban. Eredményeinket a korábbi irodalmi adatokkal összevetve a jelentős különbséget mutató molekulákkal kapcsolatban az alábbi megfigyelések tehetők.

A tenaszcinok ötféle tagból (tenaszcin-C, -R, -X, -Y, -W) álló nagyméretű ECM glikoprotein családot alkotnak. Közülük a különböző un. *alternative splicing* során létrejött többféle izoformával rendelkező tenaszcin-C kulcsszereppel rendelkezik az embriógenézisben, sebgyógyulásban, valamint a tumorprogresszióban. Malignus gliómákban a tenaszcin-C

autokrin módon növeli a glióma sejtek invazivitását, létrehozva egy reaktív változást a tumor körüli agyszövetben. Hirata és munkatársai azt találták, hogy a tenaszcin-C expresszió arányos az MRI képeken lévő peritumorális reaktív elváltozások nagyságával és a GBM betegek prognózisával [165]. Herold – Mende és munkatársai egyenes arányosságot találtak a tenaszcin-C szint emelkedése és a daganat malignitása között [166]. A tenaszcin család egy másik tagjáról, a tenaszcin-R-ről bizonyosodott be, hogy fontos szereppel bír a KIR kialakulásában, regeneráció során, valamint többféle sejt-mátrix interakcióban pl. a tumorsejtek adhéziójában és migrációjában. Mind mRNS mind fehérje szinten a tenaszcin-R szint növekedése figyelhető meg pilocitis (WHO Gr. I.) asztrocitómákban glioblasztómákkal szemben. Ezzel megegyezően a tenaszcin-R expresszió csökkenését írták le az asztrociter tumorok grádusának emelkedésekor [167]. Eredményeink az irodalmi adatokkal összhangban vannak: szignifikáns mRNS szint emelkedést találtunk tenaszcin-C és csökkenést tenaszcin-R esetében a peri-GBM mátrixban. Ezek alapján feltételezhető, hogy a tenaszcin-R akadályozza a peritumorális inváziót, míg a tenaszcin-C segítheti azt.

A fibronectin egy olyan ECM gliokoprotein dimer ami integrin sejtreceptorokhoz és más mátrix komponenshez (fibrin, kollagén, stb.) kötődik. A sejtadhéziót, migrációt és differenciálódást segítve kulcsszerepet játszik az embriógenézisben, sebgyógyulásban, daganatnövekedésben és áttétek kialakulásában. A gliómákban a fibronectin expressziója emelkedik, elősegítve ezzel a sejt migrációt és az inváziót egyenes arányban a tumor grádussal [168]. Másfelől Sabari és munkatársai vizsgálatai alapján a fibronectinben gazdag mátrix jelentősen gátolhatja a GBM sejtek szétszóródását [169]. Mi szignifikánsan alacsonyabb fibronectin fehérje szintet detektáltunk peri-GBM-ben mint peri-Met-ben, mely alapján valószínűsíthető, hogy a fibronectin gátolja a tumorsejtek szomszédos agyszövetbe történő migrálását.

Bizonyos enzimek szintén nagy hatással bírnak a peritumorális invázióra. A MMP család úgy járul hozzá a daganat progresszióhoz, hogy különböző ECM komponenseket és sejtfelszíni receptorokat tud lebontani és átalakítani, ezáltal újrendezi a mátrixot, így segítve elő a sejtek közötti kommunikációt. Ami az MMP család zselatináz csoportját illeti Veeravalli szerint az MMP-9-nek nagy hatása van a glióma sejtek migrációjára és inváziójára [170]. Kísérletünkben az MMP-9 nagymértékű emelkedését tapasztaltuk peri-GBM-ben mind RNS mind fehérje szinten, ami feltehetően a peritumorális szövetbe történő tumor inváziót segíti.

A CD168 (úgy is ismert mint HMMR vagy RHAMM) egy HA receptor, ami hatással van a sejtek közötti kommunikációra, a migrációra, ezzel segítve az angiogenezist és a

metasztázisok kialakulását [171]. A CD168 kapcsolatba lépve az aktinnal a kalmodulinnal, mikrotubulusokkal és más mitózishoz kapcsolódó struktúrával expresszió emelkedést mutatott agresszív daganatokban [172]. Mi szignifikánsan magasabb CD168 mRNS és fehérje szintet találtunk a peri-GBM mintákban mind a Peri-Met-hez mind a Norm szövethez viszonyítva, ami erősen alátámasztja ezen molekula GBM peritumorális infiltrációjában betöltött szerepét.

Az intracerebrális daganatokat övező agyállomány vizsgálata alapján összefoglalásként elmondható, hogy az invázióval összefüggő ECM molekulák (inváziós panel) mRNS és fehérje szintű vizsgálata mindkét esetben definitív különbségeket talált a peritumorális szövetekben, azokat akár egymáshoz, akár tumormentes agyszövethez hasonlítottuk. Ami a peri-GBM mintákat illeti, a vizsgált molekulák nagy része nem mutatott szignifikáns eltérést, kivéve a tenascin-C és a CD168 emelkedését. Ez alapján feltételezhető, hogy a glioblasztómát körülvevő agyszövet ECM-je nem reagál határozottan a daganat terjeszkedésére. Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy az ECM nem tudja megfelelően megakadályozni a tumorsejtek peritumorális szövetbe történő invázióját. Az eredmények emellett kiemelik e két molekula glióma sejt invázióban betöltött szerepét. Másfelől azok a kiterjedt molekuláris változások, amelyek az áttéti daganattal szomszédos agyállományban jönnek létre, valószínűleg csökkentik a tumorinfiltrációt azáltal, hogy kialakul egy olyan peritumorális „háló” a metastázis körül, ami gátolja a tumorsejtek terjedését.

5.9. Az inváziós spektrum prognosztikai szerepének vizsgálata glioblasztómában

Mivel a gyógyuláshoz szükséges teljes műtéti eltávolítást a peritumorális invázió teszi kivitelezhetetlenné, és így a mindig bekövetkező lokális recidiváért is ez tehető felelőssé, ezért az inváziós molekulák kutatása az elmúlt időszakban egyre nagyobb hangsúlyt kapott. Jelen tanulmány azt vizsgálta, hogy az invázióban szerepet játszó ECM alkotók expressziója milyen összefüggést mutat a glioblasztómás betegek túlélésével? Az expresszió meghatározásához 20 ECM alkotóból állítottuk össze az inváziós spektrumot, és erre vonatkozóan végeztünk mRNS és protein szintű meghatározást.

A vizsgálatba azonos kezelési protokoll szerint kezelt glioblasztómás betegeket válogattunk be és a mintákat a tapasztalt túlélés alapján két csoportra bontva vizsgáltuk az invázióban szerepet játszó ECM komponensek expresszióját.

A statisztikai elemzések során önmagában egyetlen molekula esetében sem találtunk szignifikáns különbséget. Azonban az inváziós molekulák csoportjának expressziós értékei együtt a csoportra jellemző inváziós spektrumot képeznek, melynek statisztikai elemzésével nagy pontosságú találati eséllyel meghatározható, hogy az adott minta az alacsony vagy magas túlélésű csoportba tartozik-e? Az inváziós spektrum elemzése továbbá olyan ECM alkotókra hívta fel a figyelmet, amelyek szerepe kiemelkedően fontosnak tűnik a betegek túlélése alakulásának szempontjából, így ezek potenciális terápiás célpontok lehetnek. A statisztikai osztályozóprogramok (LWL és J48 *pruned tree*) alapján a brevikan, kadherin-12, integrin $\beta 1$, integrin $\alpha 3$, laminin $\alpha 4$ ill. $\beta 1$ kulcsmolekulaként azonosítható.

Mind az RNS, mind a protein expressziós eredmények együttes elemzése alkalmas volt arra, hogy a minták inváziós spektrumának vizsgálata alapján a betegség kimenetelére, a beteg túlélésére magas találati valószínűséggel következtethessünk. Nagy jelentőségű klinikai szempontból, hogy a módszer pozitív prediktív értéke magas, különösen a rosszabb túlélésű csoportra vonatkoztatva. A klinikai vizsgálómódszerek megbízhatóságát jellemző ROC analízis is a módszer használhatóságát támasztja alá. Az inváziós spektrum RNS expressziós vizsgálati eredményeiben 0,775; a protein expresszió esetében pedig 0,875 volt a görbe alatti terület, mely értékek – különösen a proteomikai mérések esetén – megbízható módszerről tesznek tanúbizonyságot és az inváziós spektrum prognosztikai faktorként való szerepeltetése mellett szólnak.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

6.1. Általános összefoglalás

A GBM kezelését sokáig a műtéti reszekció és az azt követő sugárkezelés jelentette. A standard WBRT protokollt később felváltotta a konformális fokális agyi besugárzás. Ezt követően a terápiás stratégia a különböző kemoterápiás szerek megjelenésével bővült, de 2005 óta világszerte a TMZ-ra épülő konkuráló kemo-irradiációs kezelés a rutin terápiás protokoll. Ennek köszönhetően a túlélési eredmények egyértelműen javultak ugyan, de még messze nem tekinthetők kielégítőnek. Úgy tűnik, hogy a DNS replikáció gátlásán alapuló antiproliferatív konkuráló kemo-irradiáció GBM esetében megközelítette korlátait, ezért egyre nagyobb szerepet kapnak a biológiai válaszmódosító anyagok alkalmazhatóságára irányuló kutatások. Egyéb szervi daganataink esetében mára már a rutinszerű protokoll részét képezi, hogy hormonokat, szintetikus hormonszerű anyagokat vagy éppen hormonok, hormonreceptorok elleni ellenanyagokat és enzim inhibitorokat alkalmaznak. Hasonlóképpen eredményesnek tűnő próbálkozás az angiogenezis-gátló gyógyszerek bevetése, vagy az ún. epigenetikus modulátorok alkalmazása. A GBM esetében a jelenlegi szerény eredményeket felmutató onkoterápia ismeretében felértékelődik minden olyan új eredmény, eljárás és gyógyszer, amely a gliómák fejlődését, progresszióját vagy invázióját gátolni képes.

Jelen tanulmányban klinikai betegvizsgálatok során megállapítottuk a glioblasztómás betegpopuláció aktuális kilátásait és az idegsebészeti, sugár- és kemoterápiától túlélésben várható eredményeket. Ezt követően megbecsültük az 1p19q kodeláció, az EGFR és integrin receptorok státusának prognosztikai jelentőségét, majd a jelenlegi terápia tökéletesítése érdekében meghatároztuk a TMZ koncentrációját szérumban és glioblasztómában.

Vizsgálataink során egyértelművé vált, hogy a GBM kezelésében is új utakat kell keresni. Miután a széleskörű irodalmi adatok szerint az asztrocitómák kezelésének kudarcáért leginkább invazív jellegük tehető felelőssé, kutatásainkat ez irányban folytatva több különböző eredetű és grádusú intracerebrális daganat peritumorális infiltrációjában szerepet játszó molekulát azonosítottunk. Meghatároztuk a molekuláris inváziós panel és a tumorspecifikus inváziós spektrum fogalmát, lelepleztük a jelenlegi onkoterápia inváziós mechanizmusokkal szembeni ineffektivitását és adatokat szolgáltatunk a normál agyszövet tumoros infiltrációval szembeni védelmi reakcióiról.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a glioblasztómás betegek túlélési paramétereinek javulása valószínűleg a különböző támadáspontú kemoterapeutikumok kombinált alkalmazásától várható.

Az inváziós spektrum nagy specifitású és szenzitivitású statisztikai valószínűséggel bíró prognosztikai faktorként megvalósítható klinikai jelentősége kiemelenedő - hiszen a műtét utáni adjuváns onkoterápia meghatározásában elsődleges szereppel bírhat. Ez leginkább abban realizálódhat, hogy a jelenlegi sablonszerű kezelés mellett objektívan megjósolható „non-responder” csoportnak vagy a protokolltól eltérő vagy amelletti kiegészítő kemoterapeutikum lenne indikálható, ami a személyre szabott neuro-onkológia megvalósulása felé már egy definitív előrelépést jelentene.

Emellett tanulmányunk alapján a jelenlegi citocid, antiproliferatív hatóanyagok mellé anti-invazív készítmények alkalmazása javasolható, melyhez az inváziós spektrum – jelentős anyagi megterhelést nem jelentő – meghatározása az igen heterogén magas grádusú asztrocitómák esetében pontos molekuláris célpontok azonosításával járulhat hozzá. Amennyiben ezek alkalmazásával sikerül a glioblasztómás betegek esetében a peritumorális inváziót redukálni, akkor nem csak a teljes műtéti eltávolítás esélye javulhat, hanem a stereotaxiás sugársebészeti kezelés indikációja is megfontolható lenne. Mindezen széleskörű kezelési eszközök tumorspecifikus összeválogatásának individuális alkalmazása pedig megteremtheti a heterogén tumorokra jelenleg egyedül választható sablonszerű kezelés helyett a molekuláris patológiai leleteken nyugvó személyre szabott neuro-onkoterápia alapjait.

6.2. A disszertációban megerősített vagy módosított korábbi tudományos eredmények

1. Glioblasztómás betegek klinikai paramétereinek elemzése során megállapítottuk, hogy a jó preoperatív Karnofsky pontszámú betegek esetében a beteg neme, kora, a daganat oldalisága, mérete és lokalizációja önálló prognosztikai faktorként nem szerepeltethető. A betegek túlélési esélyeinek növeléséért az idegsebészeti eszköztár egyedül a műtéti radikalitás kiterjesztésével tud hozzájárulni, de amennyiben e szempontból elérte korlátait, a kezelés effektivitása és a glioblasztómás betegek túlélése elsősorban az onkológiai terápiától és a daganat kemoszenzitivitásától függ. Mivel a teljes dózisú radio- és kemoterápia csak KPS 70 felett adható, ezért a korábbi felfogással szemben a műtéti reszekciónál a jó neurológiai státusz megőrzése előbbre való szempont, mint a tumor eltávolításának kiterjesztésére való törekvés. Fentiek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az azonos esélyekkel induló betegek

túlélését nem a klinikai paraméterek befolyásolják, hanem inkább a daganat sugár- és kemoszenzitivitása határozza meg.

2. A különböző sugárterápiás metódusok effektivitásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a palliatív radioterápia a progressziómentes túlélést nem befolyásolja, így ebben a betegpopulációban indikációja erősen kérdésesnek tekinthető.

3. Saját beteganyagon igazolni tudtuk, hogy oligo-asztrocitómák és oligodendrogliómák esetében a III-as grádusú daganatokban a kor előrehaladtával csökken a kemoterápiára érzékeny, jobb prognózisú betegek aránya, ami az idősebb korban jelentkező tumorok agresszívebb jellege mellett szól. Ugyanebben a csoportban az 1p/19q-kodelécia esetében a teljes reszekció a recidívamentes túlélést egyértelműen meghosszabbította, így egy esetleges előzetes biopsziából kimutatott 1p19q kodelécia pozitivitás anaplasztikus oligodendroglióma esetében a műtéti tömegredukció forszírozása mellett szólhat.

6.3. A disszertációban megállapított új tudományos eredmények

1. Kidolgoztuk a temozolomid szérumbeli koncentrációja rutinszerű meghatározásának módszerét. Ennek eredményeképpen megállapítottuk, hogy glioblasztómás betegek esetében a konkuráló fázisban a sugárkezelést a TMZ bevétele utáni 1-2 óra közötti intervallumban optimális elvégezni és erre vonatkozó protokollmódosító javaslatot tettünk.

2. Meghatároztuk a temozolomid lokális intratumorális koncentrációját humán glioblasztómában és az irodalomban elsőként publikáltuk.

3. Igazolni tudtuk, hogy a fokozott integrin- β 1 expresszió és az ErbB1-integrin- β 1 heteroasszociációk emelkedett aránya az asztrocitómák esetében kedvezőtlen prognosztikai faktorként használható.

4. Megállapítottuk továbbá, hogy a rekurrens glioblasztómákra nem jellemző az EGFR kináz domén mutációja, ami a glioblasztómák kezelésére elvben alkalmazható tirozin-kináz-inhibitorok várhatóan mérsékelt effektivitását vetíti előre.

5. Létrehoztunk egy intracerebrális daganatok peritumorális infiltrációjának vizsgálatára alkalmazható, releváns ECM komponensekből álló inváziós panelt. Ennek segítségével az egyes szövettani diagnózisokra jellegzetes inváziós spektrumot azonosítani tudtuk. Az inváziós spektrum az egyes daganattípusra igen nagyfokú specifitást mutat, igazolva ezzel egyrészt az invázióért felelős ECM komponensek expressziójának tumorspecifikus jellegét, másrészt az asztrocitómák grádusmeghatározásához is jelentős segítséget nyújthat.

6. Az inváziós spektrum vizsgálata során több olyan molekulát tudtunk azonosítani (brevikán, integrin- β 1, integrin- α 3, kadherin-12, laminin- α 4, - β 1, neurokán, tenaszcin-C és verzikán), melyek asztrocitómák esetében az anti-invazív onkoterápiához a jövőben targetként szolgálhatnak.

7. Kimutattuk, hogy a konkuráló kemoirradiáció nem hat kellő mértékben a glioblasztóma sejtek inváziós képességére. Az inváziós panel elemei közül csak két molekula expressziója változott meg szignifikánsan (brevikán és MMP-9), melyek azonban új, célzott anti-inváziós kezelések kifejlesztéséhez szintén targetként szerepeltethetők.

8. A peri-tumorális agyállomány inváziós paneljének vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a glioblasztómát körülvevő agyszövet ECM összetételét tekintve nem reagál határozottan a daganat terjeszkedésére. Valószínűleg ezzel magyarázható, hogy az ECM nem tudja megfelelően megakadályozni a gliómasejtek peritumorális szövetbe történő invázióját. Másfelől azok a kiterjedt molekuláris változások, amelyek az áttéti daganattal szomszédos agyállományban detektálhatók, valószínűleg csökkentik a tumorinfiltrációt azáltal, hogy olyan peritumorális ECM struktúra alakul ki a metasztázisok körül, ami gátolni képes a tumorsejtek terjedését.

9. A glioblasztómás betegek esetében új prognosztikai faktort és potenciális prediktív faktort dolgoztunk ki: az inváziós spektrum a várható túléléssel egyértelmű összefüggést mutatott, így műtét utáni meghatározása egyrészt prognosztikai célból, másrészt az adjuváns onkoterápia megválasztásához prediktív célból javasolható.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* 114:97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4
2. Henriksson R, Asklund T, Poulsen HS (2011) Impact of therapy on quality of life, neurocognitive function and their correlates in glioblastoma multiforme: A review. *Journal of Neuro-Oncology* 104:639–646. doi: 10.1007/s11060-011-0565-x
3. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. (2014) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-Oncology* 16 :iv1–iv63. doi: 10.1093/neuonc/nou223
4. Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, et al. (2010) Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int* 107:799–807. doi: 10.3238/arztebl.2010.0799
5. Wrensch M, Minn Y, Chew T, et al. (2002) Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncology* 4:278–99. doi: 10.1093/neuonc/4.4.278
6. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology* 10:459–466. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7
7. Kushnir I, Tzuk-Shina T (2011) Efficacy of treatment for glioblastoma multiforme in elderly patients (65+): a retrospective analysis. *The Israel Medical Association journal* : IMAJ 13:290–294. doi: papers2://publication/uuid/B5B77DD1-5B6B-4EA1-8507-C8D9FE400CC7
8. Lamborn KR, Chang SM, Prados MD (2004) Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro-oncology* 6:227–35. doi: 10.1215/S1152851703000620
9. Bloom HJ (1975) Combined modality therapy for intracranial tumors. *Cancer* 35:111–20.
10. Salazar OM, Rubin P, Feldstein ML, Pizzutiello R (1979) High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: final report. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 5:1733–1740.
11. Walker MD, Alexander E, Hunt WE, et al. (1978) Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *Journal*

- of neurosurgery 49:333–343. doi: 10.3171/jns.1978.49.3.0333
12. Walker MD, Green SB, Byar DP, et al. (1980) Randomized Comparisons of Radiotherapy and Nitrosoureas for the Treatment of Malignant Glioma After Surgery. *New England Journal of Medicine* 303:1323–1329. doi: 10.1056/NEJM198012043032303
 13. Walker MD, Strike TA, Sheline GE (1979) An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 5:1725–1731. doi: 10.1016/0360-3016(79)90553-4
 14. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* 352:987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330
 15. Klekner, A; Fekete, G; Tóth, J; Adamecz, Zs; Ruzsithi, P; Varga, I; Szabó, P; Bogнар L (2010) Glioblasztomás betegek várható túlélésének alakulása a terápia függvényében saját beteganyagon. *MANOT 2010*
 16. Lai A, Tran A, Nghiemphu PL, et al. (2010) Phase II Study of Bevacizumab Plus Temozolomide During and After Radiation Therapy for Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme. *Journal of Clinical Oncology* 29:142–148. doi: 10.1200/JCO.2010.30.2729
 17. Grossman SA, Ye X, Piantadosi S, et al. (2010) Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 16:2443–2449. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3106
 18. Birol Sarica F, Tufan K, Cekinmez M, et al. (2010) Effectiveness of temozolomide treatment used at the same time with radiotherapy and adjuvant temozolomide; concomitant therapy of glioblastoma multiforme: multivariate analysis and other prognostic factors. *Journal of neurosurgical sciences* 54:7–19.
 19. Stupp R, Hottinger AF, van den Bent MJ, et al. (2008) Frequently asked questions in the medical management of high-grade glioma: A short guide with practical answers. *Annals of Oncology*. doi: 10.1093/annonc/mdn474
 20. Cloughesy, T. F.; Prados, M. D.; Wen, P. Y.; Mikkelsen, Abrey, L. E.; Schiff, D. ; Yung, W. K. ; Maoxia, Z.; Dimery, I; Friedman HS (2010) A phase II, randomized, non-comparative clinical trial of the effect of bevacizumab (BV) alone or in combination with irinotecan (CPT) on 6-month progression free survival (PFS6) in recurrent, treatment-refractory glioblastoma (GBM). *Journal of Clinical Oncology*, 2008 ASCO Annual

- Meeting Proceedings. Vol 26, No 15S (May 20 Supplement), 2008: 2010b
21. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, et al. (2009) Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 27:4733–4740. doi: 10.1200/JCO.2008.19.8721
 22. Shirai K, Siedow MR, Chakravarti A (2012) Antiangiogenic therapy for patients with recurrent and newly diagnosed malignant gliomas. *Journal of oncology* 2012:193436. doi: 10.1155/2012/193436
 23. Holdhoff M, Grossman S a (2011) Controversies in the adjuvant therapy of high-grade gliomas. *The oncologist* 16:351–358. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0335
 24. Darkes MJM, Plosker GL, Jarvis B (2002) Temozolomide: A review of its use in the treatment of malignant gliomas, malignant melanoma and other advanced cancers. *American Journal of Cancer* 1:55–80.
 25. Baker SD, Wirth M, Statkevich P, et al. (1999) Absorption, metabolism, and excretion of ¹⁴C-temozolomide following oral administration to patients with advanced cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 5:309–317.
 26. Zhang H, Berezov A, Wang Q, et al. (2007) ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *The Journal of clinical investigation* 117:2051–8. doi: 10.1172/JCI32278
 27. Sartor CI (2003) Epidermal growth factor family receptors and inhibitors: radiation response modulators. *Seminars in radiation oncology* 13:22–30. doi: 10.1053/srao.2003.50003
 28. Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Lammering G, et al. (2003) ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene* 22:5855–65. doi: 10.1038/sj.onc.1206698
 29. Citri A, Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews Molecular cell biology* 7:505–16. doi: 10.1038/nrm1962
 30. Bowers G, Reardon D, Hewitt T, et al. (2001) The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene* 20:1388–97. doi: 10.1038/sj.onc.1204255
 31. Basson MD (2008) An intracellular signal pathway that regulates cancer cell adhesion in response to extracellular forces. *Cancer research* 68:2–4. doi: 10.1158/0008-5472.
 32. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, et al. (2002) Integrins in invasive growth. *The Journal of clinical investigation* 109:999–1006. doi: 10.1172/JCI15468

33. Hehlhans S, Haase M, Cordes N (2007) Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et biophysica acta* 1775:163–80. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.09.001
34. Mocanu M-M, Fazekas Z, Petrás M, et al. (2005) Associations of ErbB2, beta1-integrin and lipid rafts on Herceptin (Trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines. *Cancer letters* 227:201–12. doi: 10.1016/j.canlet.2005.01.028
35. Huang J, Hu J, Bian X, et al. (2007) Transactivation of the epidermal growth factor receptor by formylpeptide receptor exacerbates the malignant behavior of human glioblastoma cells. *Cancer research* 67:5906–13. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0691
36. Lee L-T, Huang Y-T, Hwang J-J, et al. (2004) Transinactivation of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and focal adhesion kinase phosphorylation by dietary flavonoids: effect on invasive potential of human carcinoma cells. *Biochemical pharmacology* 67:2103–14. doi: 10.1016/j.bcp.2004.02.023
37. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, et al. (2007) Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science (New York, NY)* 318:287–90. doi: 10.1126/science.1142946
38. Vereb G, Nagy P, Park JW, Szöllösi J (2002) Signaling revealed by mapping molecular interactions. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2:169–186. doi: 10.1016/S1529-1049(02)00044-2
39. Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennström S, et al. (1997) Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *The EMBO journal* 16:2783–93. doi: 10.1093/emboj/16.10.2783
40. King WG, Mattaliano MD, Chan TO, et al. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Molecular and cellular biology* 17:4406–18.
41. Guo W, Giancotti FG (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews Molecular cell biology* 5:816–26. doi: 10.1038/nrm1490
42. Katz M, Amit I, Citri A, et al. (2007) A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. *Nature cell biology* 9:961–9. doi: 10.1038/ncb1622
43. Rich JN, Hans C, Jones B, et al. (2005) Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer research* 65:4051–8. doi: 10.1158/0008-5472
44. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME (2001) EGFR and cancer prognosis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 37 Suppl 4:S9–15.

45. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine* 350:2129–39. doi: 10.1056/NEJMoa040938
46. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (New York, NY)* 304:1497–500. doi: 10.1126/science.1099314
47. Nathoo N, Goldlust S, Vogelbaum MA (2004) Epidermal growth factor receptor antagonists: novel therapy for the treatment of high-grade gliomas. *Neurosurgery* 54:1480–8; discussion 1488–9.
48. Barber TD, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE (2004) Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *The New England journal of medicine* 351:2883. doi: 10.1056/NEJM200412303512724
49. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. (2003) Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 290:2149–58. doi: 10.1001/jama.290.16.2149
50. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. (2003) Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21:2237–46. doi: 10.1200/JCO.2003.10.038
51. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. (2005) Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *The New England journal of medicine* 353:2012–24. doi: 10.1056/NEJMoa051918
52. Rich JN, Rasheed BKA, Yan H (2004) EGFR mutations and sensitivity to gefitinib. *The New England journal of medicine* 351:1260–1; author reply 1260–1.
53. Naggi A (1991) Characterisation of the glycosaminoglycan component of matrix. *Drugs under experimental and clinical research* 17:21–5.
54. Masuda-Nakagawa LM, Nicholls JG (1991) Extracellular matrix molecules in development and regeneration of the leech CNS. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 331:323–35. doi: 10.1098/rstb.1991.0024
55. Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M (1988) The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *Journal of neurosurgery*

- 69:155–70. doi: 10.3171/jns.1988.69.2.0155
56. Daley WP, Peters SB, Larsen M (2008) Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of cell science* 121:255–64. doi: 10.1242/jcs.006064
 57. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A (2004) From cell-ECM interactions to tissue engineering. *Journal of cellular physiology* 199:174–80. doi: 10.1002/jcp.10471
 58. Kroening S, Goppelt-Strube M (2010) Analysis of matrix-dependent cell migration with a barrier migration assay. *Science signaling* 3:pl1. doi: 10.1126/scisignal.3126pl1
 59. Lortat-Jacob H, Grimaud JA (1994) [The extracellular matrix: from supporting tissue to regulation of cytokines]. *Pathologie-biologie* 42:612–20.
 60. Bouterfa H, Darlapp AR, Klein E, et al. (1999) Expression of different extracellular matrix components in human brain tumor and melanoma cells in respect to variant culture conditions. *Journal of neuro-oncology* 44:23–33.
 61. Gladson CL (1999) The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58:1029–1040.
 62. Klekner A, Varga I, Bognár L, et al. (2010) Extracellular matrix of cerebral tumors with different invasiveness. *Ideggyógyászati szemle* 63:38–43.
 63. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, et al. (2004) Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36:1046–69. doi: 10.1016/j.biocel.2004.01.013
 64. Varga I, Hutóczki G, Petrás M, et al. (2010) Expression of invasion-related extracellular matrix molecules in human glioblastoma versus intracerebral lung adenocarcinoma metastasis. *Zentralblatt für Neurochirurgie* 71:173–180. doi: 10.1055/s-0030-1249698
 65. Petrás M, Hutóczki G, Varga I, et al. (2009) Expression pattern of invasion-related molecules in cerebral tumors of different origin. *Magyar Onkológia* 53:253–258. doi: 10.1556/MOnkol.53.2009.3.3
 66. Czirok A, Zamir EA, Filla MB, et al. (2006) Extracellular Matrix Macroassembly Dynamics in Early Vertebrate Embryos. *Current Topics in Developmental Biology* 73:237–258. doi: 10.1016/S0070-2153(05)73008-8
 67. Jung S, Moon K-SS, Kim S-TT, et al. (2007) Increased expression of intracystic matrix metalloproteinases in brain tumors: relationship to the pathogenesis of brain tumor-associated cysts and peritumoral edema. *Journal of Clinical Neuroscience* 14:1192–1198. doi: 10.1016/j.jocn.2006.11.009
 68. Leivonen M, Lundin J, Nordling S, et al. (2004) Prognostic value of szindekán-1 expression in breast cancer. *Oncology* 67:11–18. doi: 10.1159/000080280

69. Pakula R, Melchior A, Denys A, et al. (2007) Szindekán-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology* 17:492–503. doi: 10.1093/glycob/cwm009
70. Shibata S, Fukada K, Suzuki S, et al. (2001) Histochemical localisation of vezikán, aggrecan and hyaluronan in the developing condylar cartilage of the fetal rat mandible. *J Anat* 198:129–135.
71. Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC (1999) Cell-extracellular matrix interaction in glioma invasion. *Acta Neurochirurgica* 141:295–305.
72. Nicholson C, Syková E (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in Neurosciences* 21:207–215. doi: 10.1016/S0166-2236(98)01261-2
73. Novak U, Kaye AH (2000) Extracellular matrix and the brain: components and function. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 7:280–290. doi: 10.1054/jocn.1999.0212
74. Paulus W (1998) Brain extracellular matrix, adhesion molecules, and glioma invasion. *Brain tumor invasion: biological, clinical and therapeutic considerations* Wiley-Liss, New York 301–322.
75. Zamecnik J., Vargova L., Homola A., et al. (2004) Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 30:338–350.
76. Langley RR, Fidler IJ (2011) The seed and soil hypothesis revisited-The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *International Journal of Cancer* 128:2527–2535.
77. Kalluri R (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews Cancer* 3:422–433.
78. Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Date I (2011) Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathology* 28:13–24. doi: 10.1007/s10014-010-0007-z
79. Calogero A, Pavoni E, Gramaglia T, et al. (2006) Altered expression of alpha-dystroglycan subunit in human gliomas. *Cancer biology & therapy* 5:441–448.
80. Demuth T, Berens ME (2004) Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *Journal of neuro-oncology* 70:217–28. doi: 10.1007/s11060-004-2751-6
81. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual review of biochemistry* 65:475–502. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002355

82. Soroceanu L, Manning TJ, Sontheimer H (2001) Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* 33:107–17.
83. Bozzi M, Morlacchi S, Bigotti MG, et al. (2009) Functional diversity of dystroglycan. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 28:179–87. doi: 10.1016/j.matbio.2009.03.003
84. Beadle C, Assanah MC, Monzo P, et al. (2008) The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Molecular biology of the cell* 19:3357–68. doi: 10.1091/mbc.E08-03-0319
85. Nolte SM, Venugopal C, McFarlane N, et al. (2013) A cancer stem cell model for studying brain metastases from primary lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 105:551–62. doi: 10.1093/jnci/djt022
86. Johnson JD, Young B (1996) Demographics of brain metastasis. *Neurosurgery clinics of North America* 7:337–44.
87. Chi A, Komaki R (2010) Treatment of brain metastasis from lung cancer. *Cancers* 2:2100–37. doi: 10.3390/cancers2042100
88. Varga I, Hutóczki G, Szemcsák CD, et al. (2012) Brevikán, neurokán, tenaszcin-C and verzikán are mainly responsible for the invasiveness of low-grade astrocytoma. *Pathology and Oncology Research* 18:413–420.
89. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* 25:402–408.
90. Bradford M (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254.
91. Iuga C, Seicean A, Iancu C, et al. (2014) Proteomic identification of potential prognostic biomarkers in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 14:945–955.
92. Dogan A (2014) Advances in clinical applications of tissue proteomics: opportunities and challenges. *Expert review of proteomics* 11:531–3. doi: 10.1586/14789450.2014.953062
93. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular systems biology* 4:222.
94. Blankley RT, Fisher C, Westwood M, et al. (2013) A label-free selected reaction monitoring workflow identifies a subset of pregnancy specific glycoproteins as potential predictive markers of early-onset pre-eclampsia. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12:3148–59. doi: 10.1074/mcp.M112.026872

95. Martínez-Aguilar J, Molloy MP (2013) Label-free selected reaction monitoring enables multiplexed quantitation of S100 protein isoforms in cancer cells. *Journal of proteome research* 12:3679–88. doi: 10.1021/pr400251t
96. Back MF, Ang ELL, Ng W-H, et al. (2007) Improved median survival for glioblastoma multiforme following introduction of adjuvant temozolomide chemotherapy. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 36:338–42.
97. Chaichana KL, Chaichana KK, Olivi A, et al. (2011) Surgical outcomes for older patients with glioblastoma multiforme: preoperative factors associated with decreased survival. Clinical article. *Journal of neurosurgery* 114:587–94. doi: 10.3171/2010.8.JNS1081
98. Donato V, Papaleo A, Castrichino A, et al. Prognostic implication of clinical and pathologic features in patients with glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide. *Tumori* 93:248–56.
99. Reddy KS (2008) Assessment of 1p/19q deletions by fluorescence in situ hybridization in gliomas. *Cancer genetics and cytogenetics* 184:77–86. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.03.009
100. Van den Bent MJ, Reni M, Gatta G, Vecht C (2008) Oligodendroglioma. *Critical reviews in oncology/hematology* 66:262–72. doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.11.007
101. Kleihues P, Cavenee W (2000) Pathology and genetics of tumours of the nervous system. 2nd edition World Health Organization Classification of Tumours., IARC Press, Lyon
102. Burger P, Scheithauer B, Vogel F Surgical pathology of the nervous system and its coverings, 2nd editio. Churchill Livingstone, New York
103. Smith JS, Jenkins RB (2000) Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 5:D213–31. doi: 10.2741/Smith
104. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, et al. (1994) Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *The American journal of pathology* 145:1175–90.
105. Smith JS, Alderete B, Minn Y, et al. (1999) Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene* 18:4144–52. doi: 10.1038/sj.onc.1202759
106. Smith JS, Perry A, Borell TJ, et al. (2000) Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18:636–45.

107. Reifenberger G, Louis DN (2003) Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62:111–26.
108. Hilton DA, Melling C (2004) Genetic markers in the assessment of intrinsic brain tumours. In: *Current Diagnostic Pathology*. pp 83–92
109. Griffin C a, Burger P, Morsberger L, et al. (2006) Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65:988–994. doi: 10.1097/01.jnen.0000235122.98052.8f
110. Jenkins RB, Blair H, Ballman K V, et al. (2006) A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer research* 66:9852–61. doi: 10.1158/0008-5472.1796
111. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *Journal of the National Cancer Institute* 90:1473–9.
112. Jaeckle KA, Ballman K V, Rao RD, et al. (2006) Current strategies in treatment of oligodendroglioma: evolution of molecular signatures of response. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24:1246–52. doi: 10.1200/JCO.2005.04.9874
113. van den Bent MJ, Looijenga LHJ, Langenberg K, et al. (2003) Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features. *Cancer* 97:1276–84. doi: 10.1002/cncr.11187
114. Cairncross JG, Macdonald DR (1991) Chemotherapy for oligodendroglioma. Progress report. *Archives of neurology* 48:225–7.
115. Wharton SB, Maltby E, Jellinek DA, et al. (2007) Subtypes of oligodendroglioma defined by 1p,19q deletions, differ in the proportion of apoptotic cells but not in replication-licensed non-proliferating cells. *Acta neuropathologica* 113:119–27. doi: 10.1007/s00401-006-0177-2
116. Idbaih A, Omuro A, Ducray F, Hoang-Xuan K (2007) Molecular genetic markers as predictors of response to chemotherapy in gliomas. *Current opinion in oncology* 19:606–11. doi: 10.1097/CCO.0b013e3282f075f3
117. Mueller W, Hartmann C, Hoffmann A, et al. (2002) Genetic signature of oligoastrocytomas correlates with tumor location and denotes distinct molecular subsets. *The American journal of pathology* 161:313–9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64183-1

118. Raghavan R, Balani J, Perry A, et al. (2003) Pediatric oligodendrogliomas: a study of molecular alterations on 1p and 19q using fluorescence in situ hybridization. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62:530–7.
119. Portnow J, Badie B, Chen M, et al. (2009) The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15:7092–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1349
120. Kim HK, Lin CC, Parker D, et al. (1997) High-performance liquid chromatographic determination and stability of 5-(3-methyltriazene-1-yl)-imidazo-4-carboximide, the biologically active product of the antitumor agent temozolomide, in human plasma. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 703:225–33.
121. Friedlander DR, Zagzag D, Shiff B, et al. (1996) Migration of brain tumor cells on extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves alphaV and beta1 integrins. *Cancer research* 56:1939–47.
122. Westhoff MA, Zhou S, Bachem MG, et al. (2008) Identification of a novel switch in the dominant forms of cell adhesion-mediated drug resistance in glioblastoma cells. *Oncogene* 27:5169–81. doi: 10.1038/onc.2008.148
123. Abdollahi A, Griggs DW, Zieher H, et al. (2005) Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 11:6270–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1223
124. Eller JL, Longo SL, Kyle MM, et al. (2005) Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab augments radiation effects in glioblastoma multiforme in vitro and in vivo. *Neurosurgery* 56:155–62; discussion 162.
125. Lomonaco SL, Finniss S, Xiang C, et al. (2011) Cilengitide induces autophagy-mediated cell death in glioma cells. *Neuro-oncology* 13:857–65. doi: 10.1093/neuonc/nor073
126. Kreisl TN, McNeill KA, Sul J, et al. (2012) A phase I/II trial of vandetanib for patients with recurrent malignant glioma. *Neuro-oncology* 14:1519–26. doi: 10.1093/neuonc/nos265
127. Lee EQ, Kuhn J, Lamborn KR, et al. (2012) Phase I/II study of sorafenib in combination with temsirolimus for recurrent glioblastoma or gliosarcoma: North American Brain Tumor Consortium study 05-02. *Neuro-oncology* 14:1511–8. doi: 10.1093/neuonc/nos264
128. Razis E, Selviaridis P, Labropoulos S, et al. (2009) Phase II study of neoadjuvant

- imatinib in glioblastoma: evaluation of clinical and molecular effects of the treatment. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15:6258–66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1867
129. Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, et al. (2007) Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25:1651–7. doi: 10.1200/JCO.2006.06.6514
 130. Mikkelsen T, Brodie C, Finniss S, et al. (2009) Radiation sensitization of glioblastoma by cilengitide has unanticipated schedule-dependency. *International journal of cancer* 124:2719–27. doi: 10.1002/ijc.24240
 131. Aldape KD, Ballman K, Furth A, et al. (2004) Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 63:700–7.
 132. Giese A, Rief MD, Loo MA, Berens ME (1994) Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Research* 54:3897–3904.
 133. Giese A, Kluwe L, Laube B, et al. (1996) Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery* 38:755–764.
 134. Lo CK, Yu CH, Ma CC, et al. (2010) Surgical management of primary non-small-cell carcinoma of lung with synchronous solitary brain metastasis: Local experience. *Hong Kong Medical Journal* 16:186–191.
 135. Pfannschmidt J, Dienemann H (2010) Surgical treatment of oligometastatic non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 69:251–258. doi: 10.1016/j.lungcan.2010.05.003
 136. Abacioglu U, Caglar H, Atasoy BM, et al. (2010) Gamma knife radiosurgery in non small cell lung cancer patients with brain metastases: treatment results and prognostic factors. *J BUON* 15:274–280.
 137. Gary SC, Hockfield S (2000) BEHAB/brevikan: an extracellular matrix component associated with invasive glioma. *Clinical neurosurgery* 47:72–82.
 138. Viapiano MS, Hockfield S, Matthews RT (2008) BEHAB/brevikan requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion. *Journal of Neuro-Oncology* 88:261–272. doi: 10.1007/s11060-008-9575-8
 139. Mahesparan R, Read T-A, Lund-Johansen M, et al. (2003) Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropath* 105:49–57.
 140. Tews DS (2000) Adhesive and invasive features in gliomas. *Pathol Res Pract* 196:701–

711. doi: 10.1016/S0344-0338(00)80122-3
141. Guo P, Imanishi Y, Cackowski FC, et al. (2005) Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloprotease-2, membrane type 1 metalloprotease, and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma. *The American journal of pathology* 166:877–890. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62308-5
 142. Watanabe A, Mabuchi T, Satoh E, et al. (2006) Expression of szindekán, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor-kappaB in upregulation of szindekán-1 expression. *Journal of neuro-oncology* 77:25–32. doi: 10.1007/s11060-005-9010-3
 143. Higuchi M, Ohnishi T, Arita N, et al. (1993) Expression of tenascin in human gliomas: its relation to histological malignancy, tumor dedifferentiation and angiogenesis. *Acta neuropathologica* 85:481–7.
 144. Zagzag D, Friedlander DR, Dosik J, et al. (1996) Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. *Cancer Research* 56:182–189.
 145. Paulus W, Baur I, Beutler AS, Reeves SA (1996) Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 75:819–826.
 146. Arnold SM, Young AB, Munn RK, et al. (1999) Expression of p53, bcl-2, E-cadherin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in paired primary tumors and brain metastasis. *Clinical Cancer Research* 5:4028–4033.
 147. Sunami E, Tsuno N, Osada T, et al. (2000) MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *The oncologist* 5:108–14. doi: 10.1634/theoncologist.5-2-108
 148. Delpech B, Maingonnat C, Girard N, et al. (1993) Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *European Journal of Cancer* 29:1012–1017. doi: 10.1016/S0959-8049(05)80214-X
 149. Oz B, Karayel F a, Gazio NL, et al. (2000) The distribution of extracellular matrix proteins and CD44S expression in human astrocytomas. *Pathology oncology research : POR* 6:118–124. doi: 10.1007/BF03032361
 150. Ranuncolo SM, Ladedá V, Specterman S, et al. (2002) CD44 expression in human gliomas. *J Surg Oncol* 79:30–5; discussion 35–6.
 151. Wiranowska M, Ladd S, Smith SR, Gottschall PE (2006) CD44 adhesion molecule and neuro-glial proteoglycan NG2 as invasive markers of glioma. *Brain Cell Biology*

- 35:159–172. doi: 10.1007/s11068-007-9009-0
152. Pirinen R, Leinonen T, Bohm J, et al. (2005) Verzikán in nonsmall cell lung cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors, and prognosis. *Human pathology* 36:44–50. doi: 10.1016/j.humpath.2004.10.010
 153. Han JY, Kim HS, Lee SH, et al. (2003) Immunohistochemical expression of integrins and extracellular matrix proteins in non-small cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Lung cancer* 41:65–70. doi: S0169500203001466 [pii]
 154. Khan ZA, Caurtero J, Barbin YP, et al. (2005) ED-B fibronectin in non-small cell lung carcinoma. *Exp Lung Res* 31:701–711. doi: W40P58018XP1477U [pii]r10.1080/01902140591007236
 155. Niki T, Kohno T, Iba S, et al. (2002) Frequent co-localization of Cox-2 and laminin-5 gamma2 chain at the invasive front of early-stage lung adenocarcinomas. *The American journal of pathology* 160:1129–41. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64933-4
 156. Szelachowska J, Jelen M, Kornafel J (2006) Prognostic significance of intracellular laminin and Her2/neu overexpression in non-small cell lung cancer. *Anticancer Research* 26:3871–3876.
 157. Pirinen R, Tammi R, Tammi M, et al. (2001) Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* 95:12–17. doi: 10.1002/1097-0215(20010120)95:1<12::AID-IJC1002>3.0.CO;2-E
 158. Lee L-N, Kuo S-H, Lee Y-C, et al. (2005) CD44 splicing pattern is associated with disease progression in pulmonary adenocarcinoma. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 104:541–8.
 159. Nackaerts K, Verbeken E, Deneffe G, et al. (1997) Heparan sulfate proteoglycan expression in human lung-cancer cells. *International Journal of Cancer* 74:335–345. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970620)74:3<335::AID-IJC18>3.0.CO;2-A
 160. Shah L, Walter KL, Borczuk AC, et al. (2004) Expression of szindekán-1 and expression of epidermal growth factor receptor are associated with survival in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 101:1632–1638. doi: 10.1002/cncr.20542
 161. Trog D, Yeghiazaryan K, Fountoulakis M, et al. (2006) Pro-invasive gene regulating effect of irradiation and combined temozolomide-radiation treatment on surviving human malignant glioma cells. *European Journal of Pharmacology* 542:8–15. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.05.026
 162. Nakada M, Miyamori H, Kita D, et al. (2005) Human glioblastomas overexpress

- ADAMTS-5 that degrades brevikan. *Acta Neuropathologica* 110:239–246. doi: 10.1007/s00401-005-1032-6
163. Held-Feindt J, Paredes EB, Blömer U, et al. (2006) Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas. *International Journal of Cancer* 118:55–61. doi: 10.1002/ijc.21258
 164. Petrás M, Hutóczki G, Varga I, et al. (2009) [Expression pattern of invasion-related molecules in brain tumors of different origin]. *Magyar onkologia* 53:253–8. doi: 10.1556/MOnkol.53.2009.3.3
 165. Hirata E, Arakawa Y, Shirahata M, et al. (2009) Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Science* 100:1451–1459. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01189.x
 166. Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, et al. (2002) Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *International journal of cancer Journal international du cancer* 98:362–9. doi: 10.1002/ijc.10233
 167. El Ayachi I, Baeza N, Fernandez C, et al. (2010) KIAA0510, the 3'-untranslated region of the tenascin-R gene, and tenascin-R are overexpressed in pilocytic astrocytomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36:399–410. doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01074.x
 168. Lin Z-X, Yang L-J, Huang Q, Fu J (2010) Activated vascular endothelia regulate invasion of glioma cells through expression of fibronectin. *Chinese medical journal* 123:1754–61.
 169. Sabari J, Lax D, Connors D, et al. (2011) Fibronectin matrix assembly suppresses dispersal of glioblastoma cells. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0024810
 170. Veeravalli KK, Rao JS (2012) MMP-9 and uPAR regulated glioma cell migration. *Cell Adhesion and Migration* 6:509–512. doi: 10.4161/cam.21673
 171. Akiyama Y, Jung S, Salhia B, et al. (2001) Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation. *Journal of Neuro-Oncology* 53:115–127.
 172. Jung S, Ackerley C, Ivanchuk S, et al. (2001) Tracking the invasiveness of human astrocytoma cells by using green fluorescent protein in an organotypical brain slice model. *Journal of neurosurgery* 94:80–89. doi: 10.3171/jns.2001.94.1.0080

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Bognár László Professzor Úrnak a DE KK Idegsebészeti Klinika igazgatójának, hogy a klinikai tudományos munkámat támogatta, a Neuro-onkológiai Labor és az Agydaganatbank megalapításában közreműködött és fenntartásában mind a mai napig aktív szerepet játszott.

Szeretném megköszönni a számos társkutató fáradtságot nem kímélő együttműködését, melyek a kollaborációban született közlemények alapjait jelentették. Különösen kiemelném Dr. Tóth Judit, Dr. Varga Imre, Dr. Petrás Miklós, Dr. Gáspár Attila, András Melinda, Dr. Zahucky Gábor, Dr. Scholtz Beáta, Dr. Csősz Éva és Dr. Hortobágyi Tibor együttműködését és támogatását, melyek a minőségi kutatómunkához nélkülözhetetlenek voltak.

Őszintén hálás vagyok a Neuro-onkológiai Labor munkatársainak, Dr. Virga Józsefnek, Reményi-Puskár Juditnak, Dr. Hutóczki Gábornak, hogy a tudományos munka mindennapos teendőiben jelentős szerepet vállaltak és jelen disszertáció ezáltal részben az ő érdemük is lett.

Köszönöm a DE KK Idegsebészeti Klinika dolgozóinak, orvostollégáimnak, szakdolgozóinak és személyzetének, hogy a betegellátás mellett végzett kutatómunkában mellettem álltak és segítettek.

Végül szeretném megköszönni feleségemnek, Dr. Bágyi Kingának, hogy az elmúlt évek fáradalmait megosztotta velem és a nem mindig könnyű szellemi munkához háttérrel biztosított. Hasonlóképpen köszönöm gyermekeimnek, szüleimnek és testvéremnek, hogy a tudományos munka által számukra sokszor szűkre szabott időmet sosem rótták fel nekem. Köszönöm egész családom támogatását, megértését és leginkább szeretetét, mely nélkül ez a mű nem készülhetett volna el.

KUTATÁSI TÁMOGATÁSOK

A jelen disszertáció alapjait képező tudományos munka az OTKA F-049050, ETT 396/2003, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 és NAP KTIA_13_NAP-A-V/3 pályázati támogatás segítségével valósult meg. Dr. Klekner Álmos az MTA Bolyai kutatási ösztöndíjban részesül.

9. PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Petrás M., Varga I., Vereb G., Szöllősi J., Hutóczki G., Bognár L., Ruszthi P., Kenyeres A., Tóth J., Hanzély Z., Scholtz B., **Klekner A.**: Különböző eredetű malignus agydaganatok invazivitásának panelszerű vizsgálata. Magyar Onkológia, 2009; 53(3):253-8.
2. Tóth J., Egervári K., **Klekner A.**, Bognár L., Szántó J., Nemes Z., Szöllősi Z.: Analysis of EGFR gene amplification, protein over-expression and tyrosine kinase domain mutation in recurrent glioblastoma. Pathol Oncol Res. 2009 Jun;15(2):225-9. IF: 1.152
3. **Klekner A.**, Varga I., Bognár L., Hutóczki G., Kenyeres A., Tóth J., Hanzély Z., Scholtz B.: Különböző invazivitású agydaganatok extracelluláris mátrixának expressziója. Ideggyógyászati Szemle 63(1-2):38-43, 2010. IF: 0.236
4. Varga I., Hutóczki G., Petrás M., Kenyeres A., Scholtz B., Mikó E., Hanzély Z., Tóth J., Bognár L., Zahuczky G., **Klekner A.**: Expression of invasion-related extracellular matrix molecules in human glioblastoma versus intracerebral lung adenocarcinoma metastasis. Cen Eur Neurosurg, 2010 Nov;71(4):173-80. IF: 0.472
5. Andrási M., Bustos R., Gáspár A., Gomez F.A., **Klekner A.**: Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010 Jul 1;878(21):1801-8. IF: 2.971
6. **Klekner A.**, Fekete G., Rencsi M., Méhes G., Szabó P., Bognár L.: Az 1p19q kodeláció klinikai relevanciája oligodendrogliómákban a Debreceni Idegsebészeti klinikán. Clin Neurosci 2012 Jan 65(1-2) 17-24. IF: 0.348
7. Andrási M., Törzsök B., **Klekner A.**, Gáspár A.: Determination of temozolomide in serum and brain tumor with micellar electrokinetic capillary chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2011 Aug 1;879(23):2229-33. IF: 2.888
8. Varga I., Hutóczki G., Szemcsák C., Zahuczky G., Tóth J., Adamecz Z., Kenyeres A., Bognár L., Hanzély Z., **Klekner A.**: Brevikán, neurokán, tenaszcin-C and verzikán are mainly responsible for the invasiveness of low-grade astrocytoma. Pathol Oncol Res, 2012 Apr;18(2):413-20. IF: 1.555

9. Petrás M., Lajtos T., Friedländer E., **Klekner A.**, Pintye E., Feuerstein B.G., Szöllősi J., Vereb G.: Molecular interactions of ErbB1 (EGFR) and integrin- β 1 in astrocytoma frozen sections predict clinical outcome and correlate with Akt mediated in vitro radioresistance. *Neuro Oncol.* 2013 Aug;15(8):1027-40. IF: 5.286
10. Murnyák B., Csonka T., **Klekner A.**, Hortobágyi T.: Occurrence and molecular pathology of low grade gliomas. *Ideggyógyászati Szemle* 2013;66(9–10):305–311. IF: 0.343
11. Murnyák B., Csonka T., Hegyi K., Méhes G., **Klekner A.**, Hortobágyi T.: Occurrence and molecular pathology of high grade gliomas. *Ideggyógyászati Szemle* 2013;66(9–10):312–321. IF: 0.343
12. **Klekner A.**, Virga J., Tóth J., Hortobágyi T., Dér A., Szemcsák C., Bognár L.: The role of extracellular matrix components in the invasion of intracranial malignancies. *Magyar Onkológia* 2013 Dec 18;57(4):222-31.
13. Hutóczki G., Bognár L., Tóth J., Scholtz B., Zahuczky G., Hanzély Z., Csősz E., Reményi-Puskár J., Kalló G., Hortobágyi T., **Klekner A.**: Effect of concomitant radiochemotherapy on invasion potential of glioblastoma. *Pathology, Oncology and Research.* 26th Sept. 2015. IF: 1.855.
14. **Klekner A.**, Hutóczki G., Virga J., Reményi-Puskár J., Tóth J., Scholtz B., Csősz E., Kalló G., Steiner L., Hortobágyi T., Bognár L.: Expression pattern of invasion-related molecules in the peritumoral brain. *Clinical Neurology and Neurosurgery.* IF: 1.127
15. **Klekner A.**, Tóth J., Virga J., Hortobágyi T., Dér A., Szemcsák C., Reményi-Puskár J., Bognár L.: Influence of oncotherapy and clinical parameters on survival of glioblastoma patients – a single centre experience. *Neurology India.* Közlésre elfogadva: 2015.07.24. IF: 1.232

Neurology India <editor@neurologyindia.com>

To aklekner@yahoo.com 07/24/15 at 2:07 AM

Dear Dr. Klekner,

We are pleased to inform that your manuscript "Influence of oncotherapy and clinical parameters on survival of glioblastoma patients - a single centre experience" is provisionally accepted. You would receive an edited version of article in about 2-3 weeks from now for a final check and correction. Manuscript ID number is NI_464_15.

We thank you for submitting your valuable research work to Neurology India.

With warm personal regards,

Yours sincerely,

Sanjay Behari

Neurology India

16. Virga J., Bognár L., Hortobágyi T., Zahuczky G., Csósz E., Kalló Gergő, Tóth Judit, Hutóczki G., Reményi-Puskár J., Steiner L., **Klekner A.**: Prognostic role of the expression of invasion-related molecules in glioblastoma. J Neurol Surg A. Közlésre elfogadva: 2016.04.18. IF: 0.608
18-Apr-2016

Dear Dr. Klekner,

I am pleased to inform you that your manuscript entitled "PROGNOSTIC ROLE OF THE EXPRESSION OF INVASION-RELATED MOLECULES IN GLIOBLASTOMA" has been accepted in its revised form for publication in JNLS-A . The comments of the Reviewers who reviewed the revision of your manuscript are included at the end of this letter.

In addition you find your manuscript as well as this decision letter in your Author Center at "Manuscripts with Decisions".

Your manuscript will be forwarded to Georg Thieme Publishers KG. They will prepare your manuscript for printing. Thieme will contact you in the coming weeks for further details.

Thank you for your contribution. On behalf of the Editorial Board of JNLS-A , we look forward to your future contributions to the journal.

Sincerely,

Prof. Veit Rohde

Professor of Neurosurgery

Editor-in-Chief

JNLS-A

veit.rohde@med.uni-goettingen.de

További közlemények

1. Csécssei G., **Klekner A.**, Sikula J.: Posterior lumbar interbody fusion (PLIF) using the bony elements of the dorsal spinal segment. Acta Chir Hun, 36 (1-4): 54-56, 1997.
2. Csécssei G., **Klekner A.**, Dobai J., Lajgut A., Sikula J.: Posterior interbody fusion using laminectomy bone and transpedicular screw fixation in the treatment of lumbar spondylolisthesis. Surg Neurol, 53 (2-7): 2000. IF: 1.018
3. Ernestus R.I., Röhn G., Schröder R., Els T., **Klekner A.**, Paschen W., Klug N.: Polyamine metabolism in brain tumours: diagnostic relevance of quantitative biochemistry. J Neurol Neurosurg Psychiatry 71: 88-92, 2001. IF: 3.024
4. **Klekner A.**, Röhn G., Schillinger G., Schröder R., Klug N., Ernestus R.I.: ODC mRNA as a prognostic factor for recurrence in meningiomas. J Neuro-oncol. 53: 67-75, 2001. IF: 1.435
5. Gáspár A., Kardos Sz., Andrási M., **Klekner A.**: Capillary electrophoresis for the direct determination of cephalosporins in clinical samples. Chromatographia 56: 109-114, 2002. IF: 1.230

6. **Klekner A.**, Gáspár A., Kardos S., Szabó J., Csécsi G.: Cefazolin prophylaxis in neurosurgery monitored by capillary electrophoresis. *J Neurosurg Anesth*, 15: 249-254, 2003. IF: 0.959
7. **Klekner A.**, Felszeghy Sz., Tammi R., Tammi M., Csécsi G., Módos L.: Quantitative determination of hyaluronan content in cerebral aneurysms by digital densitometry. *Zentralbl Neurochir.* 2005 Nov; 66(4): 207-12. IF: 0.842
8. **Klekner A.**, Bágyi K., Bognár L., Gáspár A., Andrási M., Szabó J.: Effectiveness of cephalosporins in the sputum of patients with nosocomial bronchopneumonia. *J Clin Microbiol*, 2006 Sep; 44(9):3418-21. IF: 3.44
9. Bágyi K., **Klekner A.**, Hutóczki G., Márton I.: The role of the oral flora in the pathogenesis of aspiration pneumonia. Review. *Stomatologica Hungarica* 2006 Oct; 99(5): 205-12.
10. Andrási M., Gáspár A., **Klekner A.**: Analysis of cephalosporins in bronchial secretions by capillary electrophoresis after simple pre-treatment. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Feb 1;846(1-2):355-8. IF: 2.935
11. Dabasi G., Hauser P., Kertész G.P., Balázs G., Karádi Z., Constantin T., Bognár L., **Klekner A.**, Schuler D., Garami M.: Imaging of pediatric brain tumors using somatostatin analogue 111Ih-DTPA-D-Phe1-octreotide. *Magy Onkol*, 2007, 51(3):229-234.
12. Bágyi K., Márton I., Szabó J., Andrási M., Gáspár A., Varga I., Bognár L., **Klekner A.**: Efficacy of pre-operative cephalosporin prophylaxis in controlling pathogenic oral bacterial growth in comatose patients. *J Med Microbiol.* 2008 Jan 57:128-9. IF: 2.19
13. Bágyi K., Haczku A., Márton I., Szabó J., Gáspár A., Andrási M., Varga I., Tóth J., **Klekner A.**: Role of pathogenic oral flora in postoperative pneumonia following brain surgery. *BMC Infect Dis.* 2009 Jun 29; 9(1):104. IF: 2.55
14. Al-Halabi H., Nantel A., **Klekner A.**, Guiot M.C., Albrecht S., Garami M., Bognár L., Kavan P., Gerges N., Shirinian M., Roberge D., Muanza T., Jabado N.: Preponderance of sonic hedgehog pathway activation characterizes adult medulloblastoma. *Acta Neuropathologica*, 2011 Feb; 121(2):229-39. IF: 9.320
15. Andrási M., Gáspár A., Kovács O., Baranyai Z., **Klekner A.**, Brücher E.: Determination of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis*, 2011 Aug 32(16): 2223-2228. IF: 3.303

16. Jacob K., Quang-Khuong D.A., Jones D.T., Witt H., Lambert S., Albrecht S., Witt O., Vezina C., Shirinian M., Faury D., Garami M., Hauser P., **Klekner A.**, Bognár L., Farmer J.P., Montes J.L., Atkinson J., Hawkins C., Korshunov A., Collins V.P., Pfister S.M., Tabori U., Jabado N.: Genetic aberrations leading to MAPK pathway activation mediate oncogene-induced senescence in sporadic pilocytic astrocytomas. *Clin Cancer Res.* 2011 Jul 15;17(14):4650-60. IF: 7.742
17. Schwartzentruber J., Korshunov A., Liu X.Y.... **Klekner A.** et al.: Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in pediatric glioblastoma. *Nature* 2012 Jan, 482(7384):226-231. IF: 38.597
18. Sturm D., Witt H., Hovestadt V., Khuong-Quang D.A.... **Klekner A.** et al.: Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell.* 2012 Oct 16;22(4):425-37. IF: 24.755
19. Northcott P.A., Shih D.J., Peacock J.... **Klekner A.**, et al.: Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature.* 2012 Aug 2;488(7409):49-56. IF: 38.597
20. Fontebasso A.M., Schwartzentruber J., Khuong-Quang D.A., Liu X.Y., Sturm D., Korshunov A., Jones D.T.W., Witt H., Kool M., Albrecht S., Fleming A., Hadjadj D., Busche S., Lepage P., Montpetit A., Staffa A., Gerges N., Zakrzewska M., Zakrzewski K., Liberski P.P., Hauser P., Garami M., **Klekner A.**, Bognár L., Zadeh G., Faury D., Pfister S.M., Jabado N., Majewski J.: Mutations in *SETD2* and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. *Acta Neuropathol* 2013 May;125(5):659-69. IF: 9.777
21. Zhukova N., Ramaswamy V., Remke M.... **Klekner A.** et al.: Subgroup specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 2013 Aug 10;31(23):2927-35. IF: 17.96
22. Csonka T., Szepesi R., Bidiga L., Péter M., **Klekner A.**, Hutóczki G., Csiba L., Méhes G., Hortobágyi T.: The diagnosis of herpesencephalitis – a case-based update. *Ideggyógyászati Szemle* 2013;66(9–10):337–342. IF: 0.343
23. Kleinman C.L., Gerges N., Papillon-Cavanagh S.... **Klekner A.** et al.: Huang A., Majewski J., Jabado N.: Fusion of TTYH1 with the C19MC microRNA cluster drives expression of a brain-specific DNMT3B isoform in the embryonal brain tumor ETMR. *Nat Genet.* 2014 Jan;46(1):39-44. IF: 29.352

24. Remke M., Ramaswamy V., Peacock J.... **Klekner A.** et al.: TERT promoter mutations are highly recurrent in SHH subgroup medulloblastoma. *Acta Neuropathol.* 2013 Dec;126(6):917-29. IF: 9.777
25. Shih D.J., Northcott P.A., Remke M.... **Klekner A.** et al.: Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. *J Clin Oncol.* 2014 Mar 20;32(9):886-96. IF: 18.443
26. Fontebasso A.M., Papillon-Cavanagh S., Schwartzentruber J.... **Klekner A.** et al.: Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nat Genet.* 2014 May;46(5):462-6. IF: 29.352
27. Mezey G., Treszl A., Schally A.V., Block N.L., Vízkeleti L., Juhász A., **Klekner A.**, Nagy J., Balázs M., Halmos G., Bognár L.: Prognosis in human glioblastoma based on expression of ligand growth hormone-releasing hormone, pituitary-type growth hormone-releasing hormone receptor, its splicing variant receptors, EGF receptor and PTEN genes. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014 Oct;140(10):1641-9. IF: 3.081
28. Csonka T., Murnyák B., Szepesi R., Kurucz A., **Klekner A.**, Hortobágyi T.: Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) and p53 labelling index correlates with tumour grade in meningiomas. *Folia Neuropathol.* 2014;52(2):111-20. IF: 1.568
29. Simándi Z., Czipa E., Horváth A., Kőszeghy A., Bordás C., Póliska S., Juhász I., Imre L., Szabó G., Dezső B., Barta E., Sauer S., Károlyi K., Kovács I., Hutóczki G., Bognár L., **Klekner A.**, Szűcs P., Bálint L., Nagy L.: PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology. *Stem Cells*, 2015 Mar; 33(3):726-41. doi: 10.1002/stem.1894. IF: 6.523
30. Murnyák B., Bognár L., **Klekner A.**, Hortobágyi T.: Epigenetics of Meningiomas. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:532451. IF: 1.579
31. Zhukova N., Ramaswamy V., Remke M..., **Klekner A.** et al.: WNT activation by lithium abrogates TP53 mutation associated radiation resistance in medulloblastoma. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Dec 24;2(1):3. IF: 10.762
32. Torchia J., Picard D., Lafay-Cousin L....**Klekner A.** et al.: Molecular subgroups of atypical teratoid rhabdoid tumours in children: an integrated genomic and clinicopathological analysis. *Lancet Oncol.* 2015 May;16(5):569-82. IF: 24.690
33. Fontebasso A.M., Shirinian M., Khuong-Quang D.A., Bechet D., Gayden T., Kool M., De Jay N., Jacob K., Gerges N., Hutter B., Şeker-Cin H., Witt H., Montpetit A., Brunet S., Lepage P., Bourret G., **Klekner A.**, Bognár L., Hauser P., Garami M., Farmer J.P., Montes J.L., Atkinson J., Lambert S., Kwan T., Korshunov A., Tabori U., Collins V.P.,

- Albrecht S., Faury D., Pfister S.M., Paulus W., Hasselblatt M., Jones D.T., Jabado N.: Non-random aneuploidy specifies subgroups of pilocytic astrocytoma and correlates with older age. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):31844-56. IF: 6.359
34. Thompson E.M., Hielscher T., Bouffet E.... **Klekner A.** et al.: Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: an integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncology*, 2016 Mar 11. pii: S1470-2045(15)00581-1. IF: 24.690
35. Bandopadhyay, P., Ramkissoon L.A, Jain P.... **Klekner A.** et al.: MYB-QKI rearrangements in angiocentric glioma drive tumorigenicity through a tripartite mechanism. *Nat Genet*. 2016 Mar;48(3):273-82. IF: 29.352
36. Hortobágyi T., Bencze J., Varkoly G., Kouhsari C. M., Klekner A.: Meningioma recurrence. *Open Med. Közlésre elfogadva*: 2016.04.27. IF: 0.15
37. Csonka T., Murnyák B., Szepesi R., Bencze J., Bognár L., Klekner A., Hortobágyi T.: Assessment of candidate immunohistochemical prognostic markers of meningioma recurrence. *Folia Neuropathol. Közlésre elfogadva*: 2016.04.27. IF: 1.568

Összefoglaló tudománymetriai adatok

Tudományos in extenso közlemények száma:	53
Magyar nyelven:	10
Idegen nyelven:	43
Első és utolsó szerzős közlemények száma:	20
Első és utolsó szerzős közlemények IF:	26,135
Első és utolsó szerzős közlemények független hivatkozása:	97
In extenso közlemények impakt faktora:	387,679
Impakt faktor a PhD fokozat megszerzése után:	382,202
A téziseket megalapozó közlemények impakt faktora:	20,416
Könyvfejezetek száma (idegen nyelven):	1
Publikált absztraktok impakt faktora:	7,630
Összes IF:	395,309
Idézettségi mutatók:	
Független citáció:	1288
Összes citáció:	1641
Hirsch index:	15